

Untersuchungen zur Biotransformation
von 5-Äthyl-5-(cyclohept-1-en-1-yl)
barbitursäure (Heptabarbital)

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hans Werner Schütz
aus Dresden

Untersuchungen zur Biotransformation von 5-Äthyl-5-(cyclohept-1-en-1-yl) barbitursäure (Heptabarbital)

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hans Werner Schütz
aus Dresden



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 7. 1975

Vorsitzender der kommissarischen
Promotionskommission:

Prof. Dr. H. Behrens

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. O. Dann

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Drittberichterstatter: Prof. Dr. H. Hofmann

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Rechts-
medizin der Universität Erlangen-Nürnberg (Vorstand:
Prof. Dr. H.-B. Wuermeling) ausgeführt.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt danke
ich herzlich für die Anregung zur Arbeit, für ihr stetes
Interesse am Fortgang und die Unterstützung der Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. O. Dann, Vorstand des Instituts für
Pharmazie und Lebensmittelchemie danke ich für das mir
stets entgegengebrachte Verständnis, sowie für die
Hilfe, die mir aus seinem Institut zuteil wurde.

Den Herren Priv.Do. Dr. K. Geibel und Dr. A. Haag vom
Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-
Nürnberg danke ich für die Aufnahme der NMR- bzw. MS-
Spektren und die wertvollen Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ihre
Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1.	<u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
2.	<u>Allgemeine Übersicht über die stoffwechsel- chemischen Veränderungen der Barbiturate im Körper</u>	2
3.	<u>Identifizierung und Isolierung der renalen Ausscheidungsprodukte des Heptabarbitals</u>	6
3.1.	Angewendete Verfahren	6
3.1.1.	Extraktion und dünnschichtchromatographische Auftrennung	6
3.1.2.	Detektion	8
3.1.2.1.	Fluoreszenzlöschung	8
3.1.2.2.	Hg-I-nitrat	8
3.1.2.3.	Dinitrophenylhydrazin	8
3.1.2.4.	Spektralphotometrische Untersuchungen	9
3.2.	Durchführung der Arbeiten	13
3.2.1.	Identifizierung	13
3.2.2.	Gewinnung	15
3.2.2.1.	Extraktion	15
3.2.2.2.	Präparativ-dünnschichtchromatographische Auftrennung	15
3.2.2.3.	Weitere Reinigung	16
4.	<u>Quantitative Untersuchungen zur renalen Ausscheidung des Heptabarbitals und seiner Stoffwechselprodukte</u>	18
4.1.	Versuchsanordnung	18

4.2.	Verfahren zur quantitativen Bestimmung	18
4.3.	Arbeitsvorschrift	19
4.4.	Aufstellung der Eichfaktoren	20
4.5.	Ergebnisse	25
5.	<u>Synthesen</u>	36
5.1.	Synthesewege	36
5.2.	Arbeitsvorschriften	42
5.2.1.	Synthese der 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohepten-1-yl)barbitursäure	42
5.2.1.1.	Cyclohexan-1,3-dionmonoäthylenketal	42
5.2.1.2.	3,3-Äthylendioxy-7-carbäthoxy-cycloheptan-1-on	43
5.2.1.3.	Cycloheptan-1,3-dion-monoäthylenketal	44
5.2.1.4.	3,3-Äthylendioxyheptyliden-malodinitril	44
5.2.1.5.	5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)-barbitursäure	46
5.2.2.	5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)-barbitursäure	48
5.2.3.	5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)-barbitursäure	49
5.2.4.	5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)-barbitursäure	49
5.2.4.1.	Cyclohept-2-en-1-yl-bromid	49
5.2.4.2.	Äthyl-(cyclohept-2-en-1-yl)malonsäure-diäthylester	50
5.2.4.3.	5-Äthyl-5-(cyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure	50
5.2.4.4.	5-Äthyl-5-(4-hydroxycyclohept-2-en-1-yl)-barbitursäure	51
5.2.4.5.	5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)-barbitursäure	51
5.2.5.	5-Äthyl-5-(3-hydroxycycloheptan-1-yl)-barbitursäure	53

	Seite
5.2.6.	Hydrierung des Ausscheidungsproduktes IV 53
5.2.7.	Derivate der Stoffwechselprodukte des Heptabarbitals 54
5.2.7.1.	Darstellung des Semicarbazons des Ausscheidungsproduktes II 54
5.2.7.2.	Darstellung der Essigsäureester der Ausscheidungsprodukte III und IV 54
6.	<u>Kernresonanz-spektroskopische Untersuchungen</u> 55
7.	<u>Struktur der Ausscheidungsprodukte</u> 66
7.1.	Ausscheidungsprodukt I 66
7.2.	Ausscheidungsprodukt II 69
7.3.	Ausscheidungsprodukt III 73
7.4.	Ausscheidungsprodukt IV 77
8.	<u>Allgemeiner Teil</u> 81
8.1.	Chemikalien 81
8.2.	Dünnschichtchromatographie 81
8.3.	Meßgeräte 82
8.4.	Sonstiges 83
	Zusammenfassung 84
	Literatur 85
	Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

Die Identifizierung von Barbituraten und ihren Abbauprodukten spielt in der forensischen und klinischen Toxikologie eine große Rolle. Seit Diäthylbarbitursäure 1903 als Hyptnotikum von FISCHER und MERING ¹⁴⁾ in die Therapie eingeführt wurde, sind etwa 2.500 Barbiturate synthetisiert worden ⁴¹⁾. Hier- von werden etwa 60 Derivate therapeutisch verwendet ¹²⁾. Ob- wohl, insbesondere auf dem deutschen Markt, ein großes Angebot an anderen Hyptnotika besteht, haben die Barbiturate ihren Platz in der Therapie behauptet und bilden daher auch einen bedeutenden Anteil des klinischen und forensischen Untersu- chungsgutes. Ein Nachweis der Aufnahme eines Medikamentes oder einer Noxe verlangt die Kenntnis der Verteilung, der Ausschei- dungsverhältnisse und der stoffwechselchemischen Veränderungen der Substanz.

Für einen großen Teil der Barbiturate sind diese Veränderungen bekannt, die renalen Ausscheidungsprodukte untersucht, allge- meine Abbauewege aufgestellt worden. (Literatur siehe u.a. bei RAVENTOS ³⁸⁾, RICHARDS and TAYLOR ³⁹⁾, SCHMIDT ⁴¹⁾, MARK ²⁴⁾, BUSH und SANDERS ⁵⁾, WILLIAMS ⁵³⁾, STEWARD und STOLLMAN ⁴⁶⁾, CLARKE ⁶⁾). Bei einigen, wie z.B. beim Heptabarbital, liegen jedoch nur sehr wenig Angaben in der Literatur vor. Die Beur- teilung des Untersuchungsergebnisses z.B. einer Harnprobe ist dann oft schwierig oder gar nicht möglich.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die renale Ausscheidung des Heptabarbitals nach therapeutischer Aufnahme zu untersuchen, die Stoffwechselprodukte zu isolieren und deren Struktur aufzu- klären.

2. Allgemeine Übersicht über die stoffwechselchemischen Veränderungen der Barbiturate im Körper

Barbiturate werden nach ihrer Wirkungsdauer in vier Gruppen eingeteilt: lang-, mittel-, kurz- und ultrakurz wirkende Barbiturate. Dabei stehen Stabilität im Körper und Wirkungsdauer in engem Zusammenhang, da in der Mehrzahl der Fälle die Stoffwechselprodukte eine wesentlich geringere pharmakologische Wirkung besitzen.

WILLIAMS ⁵³⁾ unterscheidet vier wesentliche Stoffwechselwege:

- a) Veränderungen an den Substituenten in 5-Stellung des Barbiturat-Ringes
- b) Abspaltung von Gruppen am Stickstoff-Atom in 1- und 3-Stellung
(Hier handelt es sich um Alkylgruppen, meistens $-\text{CH}_3$)
- c) Umwandlung von Thiobarbituraten in Barbiturate
- d) Öffnung des Barbiturat-Ringes

Hier soll vor allem Weg a) betrachtet werden, da Weg b) und c) für Heptabarbital entfällt. Bei Weg d), der Öffnung des Barbiturat-Ringes entstehen substituierte Malonharnstoffsäuren ⁵³⁾. Sie erscheinen nur zu einem geringen Teil im Harn und sind, da sie schwer nachzuweisen und zu unterscheiden sind, nicht von analytischem Interesse.

Der größte Teil der aufgeführten Literaturstellen bezieht sich auf Untersuchungen an Tieren. Die Ergebnisse können nicht einfach auf den Menschen übertragen werden, doch geben sie Hinweise auf zu erwartende Stoffwechselprodukte.

Bei den Veränderungen an den Substituenten in 5-Stellung stehen vor allem Oxidationreaktionen im Vordergrund. Dabei wird nach WILLIAMS ⁵³⁾ immer nur ein Substituent, nach MARK ²⁴⁾ vor allem die längere Seitenkette verändert.

Hierbei treten folgende Reaktionen auf:

- 1) Oxidation zur Hydroxyl-Gruppe
- 2) Oxidation zur Keto-Gruppe
- 3) Oxidation zur Carboxyl-Gruppe
- 4) Abspaltung einer Seitenkette.

Für offenkettige Substituenten stellt die Einführung einer Hydroxylgruppe in (ω -1)-Stellung einen der häufigsten Stoffwechselschritte dar. Sie wurde u.a. beobachtet bei Secobarbital (WADDEL ⁵¹⁾, TSUKAMOTO, YOSKIMURA, IDE ⁵⁰⁾, Pentobarbital (MAYNERT, van DYKE ³⁰⁾, MAYNERT, DAWSON ²⁹⁾, Amobarbital (MAYNERT ²⁵⁾ ²⁷⁾, Vinylbital (MACHBERT, GELDMACHER-v.MALLINCK-RODT ²³⁾, PREUS, MÜLLER ³⁵⁾. Diese Oxidation kann weiterführen zur Carboxylgruppe wie beim Hexethal (MAYNERT ²⁸⁾). ω -Oxidation wurde z.B. beim Barbital (GOLDSCHMID und WEHR ¹⁸⁾) zur Hydroxyl-, bei Butabarbital (MAYNERT, LOSIN ³¹⁾), Pentobarbital (TITUS, WEIß ⁴⁷⁾) und Hexethal (MAYNERT ²⁸⁾) zur Carboxyl-Gruppe nachgewiesen.

Butallylonal und 5-(2'-bromallyl)-5-isopropyl-Barbitursäure, die beide eine 2'-bromallyl-Gruppe ($-\text{CH}_2\text{CBr:CH}_2$) enthalten, werden zum entsprechenden Acetonyl-Derivat ($-\text{CH}_2\text{COCH}_3$) oxidiert ⁵³⁾.

Die Abspaltung eines Substituenten wurde bei Barbital, Cyclobarbital und 5-Vinyl-5-äthylbarbitursäure (GOLDSCHMIDT und WEHR ¹⁸⁾, GOLDSCHMIDT und KOSS ¹⁹⁾ sowie bei Secobarbital (WADDELL ⁵¹⁾, COCHIN und DALY ⁷⁾) in geringer Menge beobachtet. Als Hauptausscheidungsprodukt tritt es bei Vinylbital (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, MACHBERT und GELDMACHER ¹⁶⁾, PREUSS und MÜLLER ³⁴⁾) auf.

Bei ringförmigen Substituenten wurden analoge Abbaureaktionen beobachtet. Phenobarbital wird in Para-Stellung des Phenylringes zur Hydroxyl-Verbindung oxidiert (CURRY ¹⁰⁾). Cyclobarbital gibt vor allem Äthyl-5-(3'-oxo-cyclohexen-1-yl)barbitursäure sowie das entsprechende 3'-Hydroxy-Derivat (GOLDSCHMIDT und KOSS ¹⁹⁾). Bei Hexobarbital wurde Oxidation in 3-Stellung des 6-Ringes zum Hydroxyl- und Keto-Derivat sowie in 6-Stellung zum Keto-Derivat nachgewiesen (BUSH et al. ⁴⁾).

Die Oxidation von Methylhexabital zu Ketomethylhexabital und die Bildung von terminalen Carboxyl-Gruppen in Barbitursäureseitenketten wurde ursprünglich dem mikrosomalen System zugeschrieben. Nach TOKI et al. ⁴⁸⁾ wird nur der erste Schritt zur Hydroxyl-Gruppe vom mikrosomalen System bewirkt. Der Folgeschritt zum Keton (bzw. Aldehyd, Carbonsäure) wird von einem löslichen Enzym in Gegenwart von NAD oder NADP durchgeführt. Dieses Enzym kann auch wieder die Reduktion des Ketons in Gegenwart von NADH oder NADPH katalysieren. Vermutlich handelt es sich hierbei um ADH (Abbildung 1).

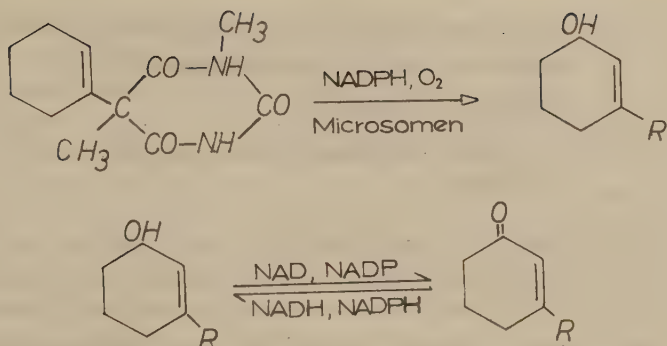


Abbildung 1

Oxidation von Methylhexabital im Körper nach TOKI et al.⁴⁸⁾

Nach Heptabarbitalaufnahme isolierte und beschrieb PULVER³⁶⁾ aus dem Harn von Menschen und Kaninchen eine Substanz, die er als Keto-Derivat identifizierte. Er vermutete, daß es sich um 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure handelt. Dabei fand er beim Menschen 1 % der aufgenommenen Dosis wieder. Unveränderte Substanz konnte nicht nachgewiesen werden. VIDIC⁵⁴⁾ fand dagegen nach Aufnahme therapeutischer Mengen von Heptabarbital bei papierchromatographischen Untersuchungen drei Stoffwechselprodukte, von denen eines durch Besprühen mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin als Keto-Derivat ausgewiesen wurde. Auch unveränderte Substanz konnte in 70 % der untersuchten Fälle in geringer Menge nachgewiesen werden. ARNOLD²⁾ fand bei massenspektrometrischen Untersuchungen der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte ein Gemisch. Aus der Fragmentierung ergab sich, daß einmal eine Keto-Gruppe, zum anderen eine Hydroxylgruppe am Siebenring liegen mußten.

3. Identifizierung und Isolierung der renalen Ausscheidungsprodukte des Heptabarbital
- 3.1. Angewendete Verfahren
- 3.1.1. Extraktion und dünnschichtchromatographische Auftrennung

Bei der chemisch-toxikologischen Analyse kommt es oft, vor allem im klinischen Bereich, auf Schnelligkeit der Untersuchung an. So ist seit Einführung der Papier- und Dünnschichtchromatographie der klassische Stas-Otto-Trennungsgang, der für klassische chemische und physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden ausgearbeitet worden war, weitgehend durch einfachere Extraktionsmethoden verdrängt worden. WALDI ⁵²⁾ empfiehlt für saure und neutrale Verbindungen im Harn eine dreimalige Extraktion mit Äther bei pH 3-4. Der Extraktrückstand wird nach Auflösen in Methanol oder Äthanol direkt für dünnschichtchromatographische Untersuchungen verwendet. Als Sorptionsmittel wird überwiegend Kieselgel verwendet.

Bei einer gezielten dünnschichtchromatographischen Untersuchung auf Barbiturate werden oft Fließmittel verwendet, die bereits anhand des Rf-Wertes Aussagen auf das Barbiturat zulassen. Bei Harnuntersuchungen ist die Anwendung dieser Fließmittel etwas problematisch. Zwar sind sie auf die geringen Polaritätsunterschiede der Barbitursäurederivate ausgelegt und die meisten, wesentlich polareren Stoffwechselprodukte bleiben am Start sitzen, doch einige weniger polare können zu Verwechslungen führen. In den Fällen, wo jedoch das unveränderte Derivat nur in verschwindend geringer Menge erscheint, können sich sogar falsch negative Befunde ergeben.

Aus diesem Grunde empfiehlt GELDMACHER-v.MALLINCKRODT ¹⁵⁾ Äther als Fließmittel. Hier zeigen zwar alle unveränderten Barbitursäurederivate einen etwa gleichen R_F -Wert von 80-90, sie werden jedoch einwandfrei von allen anderen Harnbestandteilen abgetrennt und können nach Elution aus dem Sorptionsmittel durch eine weitere Methode (z.B. Gaschromatographie) schnell und einwandfrei identifiziert werden. Stoffwechselprodukte zeigen niedrigere R_F -Werte. Sie werden jedoch auch erfaßt und können zur Identifizierung herangezogen werden.

Äther war auch für die Auftrennung der Heptabarbitalstoffwechselprodukte das geeignetste Fließmittel. Bei Verwendung von Chloroform blieben die Stoffwechselprodukte am Startfleck sitzen. Bei Dioxan schoben sie sich in der Lösungsmittelfront zusammen. Steigender Zusatz von Chloroform bzw. Dioxan zu Äther sowie Mischungen von Toluol/Butanol/Eisessig und Benzol/Äthanol/Eisessig brachten keine Verbesserung der Auftrennung. Äther erwies sich auch zur Extraktion geeignet. Zu polare Lösungsmittel erhöhten den Anteil an mitextrahierten Harnbestandteilen, unpolare ergaben keine vollständige Extraktion.

Um den Anteil an sauren Harnbestandteilen möglichst niedrig zu halten, wurde im schwach-sauren Milieu extrahiert. Ein pH-Wert von 5,5 - 6,0 gab die besten Ergebnisse. Eine vollständige Extraktion aller Stoffwechselprodukte war hier gerade noch möglich, während der Anteil an Harnbestandteilen niedrig blieb.

3.1.2. Detektion

3.1.2.1. Fluoreszenzlöschung

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurde Kieselgel mit Fluoreszenzindikator verwendet (Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl, Typ 60 "Merck"). Dadurch konnte die Lage in Frage kommender Fraktionen beim Betrachten unter UV-Licht durch Fluoreszenzlöschung bereits erkannt und , nach Anfärbung durch Reagenzien, auf nicht besprühten Teilen der Chromatogramme verfolgt werden.

3.1.2.2. Hg-I-nitrat

Die Detektion von Barbitursäuren mit Quecksilbersalzlösungen auf Dünnschichtchromatogrammen wird von allen Autoren empfohlen (z.B. STAHL ⁴³), WALDI ⁵²). Sie ist zwar nicht spezifisch, jedoch reagieren alle Barbiturate, so daß eine sichere Erkennung in Frage kommender Fraktionen möglich ist. Die Empfindlichkeit ist bei einzelnen Derivaten etwas verschieden. Sie liegt z.B. für Barbital bei 0,1 µg (WALDI ⁵²), SOEHRING ⁴²). Von mir wurde zur Detektion der Heptabarbital-Ausscheidungsprodukte gesättigte wäßrige Quecksilber-(I)-nitratlösung verwendet.

3.1.2.3. Dinitrophenylhydrazin

Zum Nachweis von Carbonylgruppen in den Seitketten der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte wurde eine gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 %iger Trichloressigsäure als Sprühreagenz verwendet. Dieses Reagenz wurde von VIDIC ⁵⁴) bei

papierchromatographischen Untersuchungen von Barbituratstoffwechselprodukten erfolgreich eingesetzt. Störungen durch harnpflichtige Substanzen treten nicht auf. Keto-körper erscheinen als rot-orange gefärbte Flecken auf gelbem Grund.

3.1.2.4. Spektralphotometrische Untersuchungen

Barbiturate zeigen charakteristische UV-Absorptionskurven. Die qualitative wie quantitative Auswertung dieser Kurven ist daher ausführlich untersucht worden (siehe u.a. bei CURRY ¹¹⁾, GOLDBAUM ¹⁷⁾, STEVENSON ⁴⁵⁾, STAINIER et al. ⁴⁴⁾, SCHMIDT ⁴¹⁾).

Die Absorption von Barbituraten der allgemeinen Formel (I) ist abhängig von den Ionisationschritten (II + III) in alkalischer Lösung:

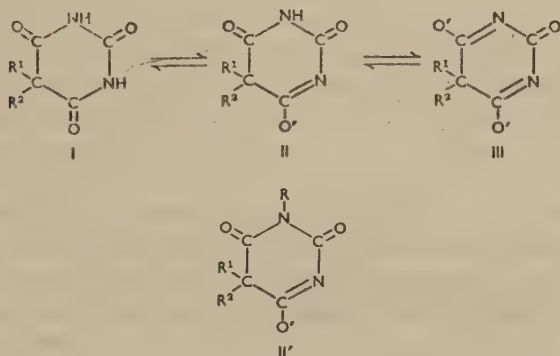


Abbildung 2 Ionisationschritte von 5-disubstituierten Barbitursäurederivaten

Ein Substituent am N₍₁₎ verhindert die Ionisation über den Schritt II' hinaus. Die Ionisation beginnt bei pH-Werten oberhalb 9,5. In 0,05 m Boratpuffer (pH 10) zeigen alle disubstituierten Barbiturate ein Absorptionsmaximum $\lambda_{\max} = \text{ca. } 240 \text{ nm}$. Oberhalb dieses pH-Wertes verschiebt sich die Absorption bis ca. $\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$ in 1 n Natronlauge. Der Extinktionskoeffizient nimmt dabei ab. Bei pH-Werten unter 8,6 liegt das Molekül in der undissoziierenden Form vor. Es zeigt dann keine spezifische Absorption mehr. Es ist lediglich eine Kurve ansteigender Absorption zu kürzeren Wellenlängen hin zu beobachten (Abbildung 3).

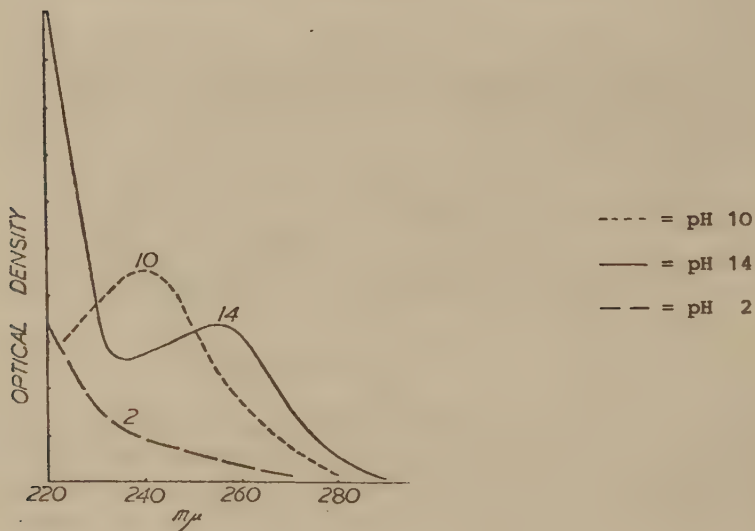


Abbildung 3

Einfluß des pH-Wertes auf die UV-Absorption von Barbituraten nach SCHMIDT ⁴¹⁾.

N-methylierte Barbiturate zeigen eine Absorption um $\lambda_{\max} = 243 \text{ nm}$ bei pH 10 und keine Verschiebung bei höheren pH-Werten.

Die Substituenten am C₍₅₎, R₁ und R₂ wirken sich nur geringfügig auf die Lage des Maximums und auf die molaren Extinktionskoeffizienten aus.

Das Fehlen eines Substituenten führt dagegen zu erheblichen Veränderungen. So zeigt 5-(1-Methylbutyl)-barbitursäure, ein Stoffwechselprodukt des Vinylbitals, bei pH 10 zwei ausgeprägte Maxima bei 238 nm und 265 nm, in 1 n NaOH ein Maximum bei 269 nm (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. 16).

Thiobarbiturate haben ebenfalls andere Absorptionsmaxima, sie liegen bei 305 nm und 255 nm für pH 10, bei 305 nm für pH 13 und 290 nm und 239 nm für pH 2.

Zur spektralphotometrischen Auswertung werden den Anfärbungen entsprechende, nicht mit Reagenz besprühte Teile des Chromatogrammes eluiert und die UV-Spektren bei den verschiedenen genannten pH-Werten von 360 nm - 220 nm aufgenommen. Aus der Lage der jeweiligen Maxima kann auf die Art des Barbiturates geschlossen werden.

Die quantitative Auswertung erfolgt über die Extinktion. In der Literatur wird oft die Extinktionsdifferenz zwischen ionisierter und nicht ionisierter Form verwendet. Die Werte sind für die einzelnen Barbiturate etwas verschieden und werden entweder als die molaren Extinktionsdifferenzen

ΔE ($1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) (BRANDENBERGER ³⁾ oder häufiger als E (1%, 1cm), die Extinktionsdifferenz einer 1 %igen Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm angegeben (CLARKE ⁶⁾, CURRY ¹⁰⁾, STEVENSON ⁴⁵⁾).

Für Heptabarbital gibt BRANDENBERGER ³⁾ an:

$$\Delta E (\text{pH } 10 / \text{ saure Lösung}) = 8200,$$

STEVENSON ⁴⁵⁾ gibt an:

$$\Delta E (1\%, 1\text{cm}; \text{pH } 10 / \text{pH } 2) = 400.$$

Diese Angaben decken sich mit eigenen Messungen.

Zur praktischen Durchführung der quantitativen Messungen mußte der Harn zunächst bei dem als günstigsten ermittelten pH-Wert (5,5 - 6) extrahiert, der Extrakt rückstand dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt, die Fraktionen ermittelt, mit Boratpuffer pH 10 eluiert und die Extinktion λ_{max} bestimmt werden. Anschließend wurde durch Zusatz von 10 μl konz. Schwefelsäure angesäuert und abermals die Extinktion bei der gleichen Wellenlänge bestimmt.

Dieses Vorgehen, das für unveränderte Substanz gut reproduzierbare Werte liefert, ließ sich auf die Stoffwechselprodukte nicht anwenden. Da sie wesentlich polarer sind, ließen sie sich weder durch geänderte Extraktionsverfahren noch dünn-schichtchromatographisch vollständig von natürlichen Harnbestandteilen abtrennen. Diese störten aber die Messung besonders im sauren Milieu. Jeder zusätzliche Reinigungsschritt

bedeutete dagegen weitere Verluste und neue Fehlerquellen. Da jedoch Absorptionen der Harnbestandteile bei pH 10 wesentlich geringer ins Gewicht fielen, wurde zur Auswertung die Extinktionsdifferenz zwischen 360 nm und λ max bei pH 10 herangezogen. Bei 360 nm zeigen Heptabarbital sowie die drei Stoffwechselprodukte keine Absorption.

3.2. Durchführung der Arbeiten

3.2.1. Identifizierung

Harn, der nach Heptabarbitalaufnahme gesammelt wurde, wurde bei pH 5,5 - 6,0 zweimal mit der doppelten Menge Äther extrahiert, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad verdampft. Den Extraktückstand löste man in wenig Äthanol. Anteile davon wurden auf eine in Bahnen eingeteilte Dünnschichtplatte (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) aufgetragen und in Äther entwickelt. Als Vergleich diente Heptabarbital. Danach wurden unter UV-Licht alle fluoreszenzlöschenden Fraktionen markiert.

Beim Besprühen einer Bahn mit Quecksilber(I)-nitrat färbten sich vier Fraktionen schwarz an. Sie wurden mit römischen Ziffern bezeichnet und hatten folgende hRf-Werte:

I	hRf-Wert:	80
II	hRf-Wert:	60
III	hRf-Wert:	50
IV	hRf-Wert:	35

Fraktion I war dabei so schwach, daß sie erst ermittelt wurde, nachdem größere Harnextraktmengen aufgetragen wurden. Eine einwandfreie Trennung der anderen drei Fraktionen war dabei nicht möglich.

Die entsprechenden Fraktionen einer nicht mit Reagenz besprühten Bahn wurden mit 0,05 m Boratpuffer (pH 10) eluiert und das UV-Spektrum mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer (Beckman, DK2) bei pH 10, pH 13 und pH 1 von 360 - 220 nm aufgenommen. Dabei zeigten alle Fraktionen Absorptionsmaxima zwischen

238 - 241 nm bei pH 10

253 - 255 nm bei pH 13

kein Maximum bei pH 1.

Die Lage der Maxima bei pH 10 und die Verschiebung im alkalischen sprachen für einen intakten Barbituratring, sowie das Vorhandensein von zwei Substituenten am C₍₅₎-Atom (siehe Kapitel 3.1.2.4.).

Beim Besprühen des Chromatogrammes mit Dinitrophenylhydrazin färbte sich die Fraktion II orange-gelb an. Dies sprach für das Vorliegen einer Keto-Gruppe an einem der Substituenten. Vermutlich handelte es sich um die gleiche Verbindung, die VIDIC ⁵⁴⁾ bei papierchromatographischen Untersuchungen nachwies und die PULVER ³⁶⁾ isolierte und beschrieb.

3.2.2. Gewinnung

3.2.2.1. Extraktion

Der Harn von Probanden, die am Abend 200 - 400 mg Heptabarbital eingenommen hatten, wurde so lange gesammelt, bis dünnschichtchromatographisch keine Stoffwechselprodukte mehr nachweisbar waren (ca. 36-48 Stunden). Der Harn wurde, falls erforderlich, mit Essigsäure auf pH 5,5 - 6,0 eingestellt und zweimal mit der doppelten Menge Äther im Scheidetrichter extrahiert, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer abdestilliert.

3.2.2.2. Präparativ-dünnschichtchromatographische Auftrennung

Der Extraktionsrückstand wurde in 1 % der ursprünglichen Harnmenge an Äthanol aufgelöst und strichförmig auf Kieselgeldünnschichtplatten aufgetragen (Platten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,3 mm, Kieselgel HF₂₅₄ "Merck"). Dickere Schichten sowie die Verwendung eines speziellen präparativen Kieselgels verschlechterten die Auftrennungsqualität so weit, daß Versuche in dieser Richtung aufgegeben wurden.

Die Platten wurden zweimal in Äther entwickelt. Der zweite Lauf erhöht die Trennschärfe etwas. Unter UV-Licht wurden alle fluoreszenzlöschenden Fraktionen markiert, die in Frage kommenden durch Besprühen eines sehr schmalen Randstreifens mit Quecksilber(I)-nitrat identifiziert und anschließend mit einem Objektträger abgehoben. Pro Platte konnte Harnextrakt entsprechend 20 - 30 ml Harn aufgetrennt werden.

Die Fraktionen wurden gesammelt und in einem Chromatographie-rohr mit reichlich Äther eluiert und der Äther am Rotations-verdampfer bis auf 10 ml abdestilliert. Diese wurden in ein Abdampfschälchen (Durchmesser 7 cm) übergeführt und auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft. Zurück blieben:

- | | | |
|----------|------|--|
| Fraktion | I: | gelblich-weiße Kristalle |
| Fraktion | II: | schwach bräunliche Kristalle |
| Fraktion | III: | glasig-spröde, durchscheinende
gelbe Substanz |
| Fraktion | IV: | bräunlich schmierige Substanz. |

3.2.2.3. Weitere Reinigung

Fraktion I wurde aus wenig Wasser umkristallisiert und ergab weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 172°C .

Fraktion II wurde aus wenig Äther umkristallisiert und ergab weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 232°C .

Die Fraktionen III und IV konnten aus keinem Lösungsmittel, noch durch Umlösen zur Kristallisation gebracht werden. Sie wurden daher in Äthanol aufgelöst und nochmals dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt. Zur Abtrennung der noch vor-handenen Harnsubstanzen eignete sich das Laufmittelgemisch Toluol, Butanol, Eisessig (80 : 20 : 2). Es wurde eine Auf-trennung in drei bis vier fluoreszenzlöschende Fraktionen er-reicht, von denen die unterste mit Quecksilber(I)-nitrat als Barbitursäurederivat identifiziert wurde. Die Auftrennung wurde

im übrigen wie im Kapitel 3.2.2.2. beschrieben durchgeführt, die jeweilige Fraktion abgehoben und mit Äther eluiert.

Nach dem Abdampfen des Äthers erhielt man für Fraktion III eine klare, glasige Substanz, die unter dem Schmelzpunktmikroskop ab 50° zerfloß, ab 80° Wasser abgab und dann bis 120° durchkristallisierte. Diese Kristalle zeigten einen Schmelzpunkt von 179°C .

Für Fraktion IV erhielt man ebenfalls eine klare, glasige Substanz, die unter dem Schmelzpunktmikroskop ab 40° zerfloß, ab 90° Wasser abgab und bis ca. 130° durchkristallisierte. Diese Kristalle zeigten einen Schmelzpunkt von $181 - 183^{\circ}\text{C}$.

Auf die beschriebene Weise konnten pro aufgenommene 200 mg Heptabarbital folgende Mengen der einzelnen Substanzen rein gewonnen werden:

I	= ca. 0,5 mg	Schmelzpunkt 172°C
II	= ca. 5 mg	Schmelzpunkt 232°C
III	= ca. 5 mg	Schmelzpunkt 179°C
IV	= ca. 2 mg	Schmelzpunkt $181^{\circ} - 183^{\circ}\text{C}$.

4. Quantitative Untersuchungen zur renalen Ausscheidung des Heptabarbitals und seiner Stoffwechselprodukte

4.1. Versuchsanordnung

Probanden nahmen abends um die gleiche Zeit (22.00 Uhr) 200 mg oder 400 mg Heptabarbital (entsprechend 1 bzw. 2 Tabletten Me-domin^R) ein. Von diesem Zeitpunkt an wurde aller Harn portionsweise gesammelt und die ausgeschiedene Menge der einzelnen Stoffwechselprodukte bestimmt. Es wurde so lange gesammelt, wie eine Bestimmung mit dem angewendeten Verfahren möglich war (bis ca. 36 Stunden). In einigen Fällen wurde nur die gesamte ausgeschiedene Menge im Sammelharn bestimmt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

4.2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung

Es wurde das in Kapitel 3.1.2.4. beschriebene Verfahren der Auswertung der Extinktionsdifferenz $\lambda_{\text{max}}/360 \text{ nm}$ (pH 10) angewendet. Um Verluste, die während der Aufarbeitung der Harnproben entstehen, weitgehend zu berücksichtigen, wurden die Arbeitsbedingungen bei allen Untersuchungen gleich gehalten. Anhand von Zusatzversuchen wurde ein Eichfaktor F ermittelt, mit dem direkt durch Multiplikation mit der Extinktionsdifferenz die Harnkonzentration K in mg% berechnet werden konnte.

$$F \cdot \Delta E = K \text{ (mg\%)}$$

Bei Harnproben, die eine Verdünnung der Meßlösung erforderten, wurde noch mit dem Verdünnungsfaktor V multipliziert, der für unverdünnte Lösungen $V = 1$ ist.

$$V \cdot F \cdot \Delta E = K \text{ (mg\%)}$$

4.3. Arbeitsvorschrift

Jeweils 25 ml Harn wurden nach Einstellen auf pH 5,5 - 6 (Essigsäure, Ammoniak) dreimal mit je 50 ml Äther in einem 250 ml Scheidetrichter extrahiert. Man schüttelte 5 Minuten kräftig durch. Die Ätherfraktionen wurden vereinigt und mit 15 g Natriumsulfat getrocknet. Dann filtrierte man ab, wusch das Natriumsulfat mit 25 ml Äther nach und destillierte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf etwa 5 ml ab. Dies wurde in ein Zentrifugenglas mit konischem Spitzboden (ca. 98 x 17 mm) überführt und auf dem Wasserbad (45°C) im Stickstoffstrom eingedampft. Der Kolben wurde noch zweimal mit je 5 ml Äther gespült und der Äther ebenfalls im Zentrifugenglas eingedampft.

Den Extraktückstand löste man dann sorgfältig in 0,5 ml Äthanol und trug Anteile von 0,04 ml auf eine, in 25 mm breite Bahnen eingeteilte, Dünnschichtplatte (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) auf. Die Platte wurde aufsteigend 15 cm in Äther entwickelt. Die Detektion erfolgte auf einer Bahn mit Quecksilber(I)-nitrat. Die entsprechenden fluoreszenzlöschenden Fraktionen auf den anderen Bahnen wurden unter UV-Licht gekennzeichnet, abgehoben, in ein Zentrifugenglas gebracht und mit 4 ml 0,5 m Boratpuffer (pH 10) 10 Minuten eluiert.

Längere Zeiten brachten keine Veränderungen der Meßergebnisse. Dann zentrifugierte man das Kieselgel ab und nahm vom Überstand das UV-Spektrum von 360 nm bis 220 nm gegen Boratpuffer auf. War die Extinktion im Maximum größer als 1, so wurde mit 0,05 m Boratpuffer verdünnt.

4.4. Aufstellung der Eichfaktoren

Zur Aufstellung der Eichfaktoren (siehe auch Kapitel 3.1.2.4.) wurden Harn die isolierten Stoffwechselprodukte in Konzentrationen von 1 mg% bis 20 mg% zugesetzt, der Harn wie in Kapitel 4.3. beschrieben aufgearbeitet und ΔE bestimmt. Es wurden jeweils drei Harnproben gleicher Konzentration aufgearbeitet. Aus den ΔE -Werten wurde für jede Versuchsreihe der Mittelwert gebildet und der Eichfaktor berechnet. Aus den Eichfaktoren wurde ebenfalls der Mittelwert gebildet und dieser Wert zur Berechnung der Analysen verwendet.

Auf diese Weise wurden die Eichfaktoren für die Stoffwechselprodukte II - IV aufgestellt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1-3 zusammengefaßt. Die Erfassungsgrenze lag bei 0,5 mg%. Für das unveränderte Heptabarbital, das nur in sehr geringer Konzentration im Harn erschien (0,1 - 0,5 mg%), war das Verfahren daher nicht anwendbar. Die ausgeschiedene Menge wurde deswegen nur im Gesamtharn bestimmt. Die Arbeitsweise wurde dahingehend abgeändert, daß 100 ml Harn extrahiert und Extraktanteile entsprechend 1/5 aufgetragen wurden. Alle anderen Bedingungen wurden wie oben beschrieben eingehalten. Die zur Bestimmung des Eichfaktors bei Zusatzversuchen erhaltenen Werte sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Harnkonzentration in mg%	ΔE der Proben			Mittelwert	Eichfaktor	Mittelwert Eichfaktor	Mit Eichfaktor ermittelte Konzentration			Mittelwert	Verdünnung der Meßlösung
	Nr.1	Nr.2	Nr.3				Nr.1	Nr.2	Nr.3		
1	0,14	0,20	0,18	0,17	5,75		0,78	1,11	0,99	0,96	-
2	0,38	0,32	0,39	0,36	5,51		2,10	1,77	2,16	2,01	-
3	0,50	0,58	0,55	0,54	5,52		2,77	3,21	3,04	3,01	-
5	0,93	0,92	0,87	0,91	5,51	5,54	5,15	5,10	4,82	5,02	-
10	0,88	0,89	0,94	0,90	5,56		9,75	9,86	10,41	10,01	1+1
15	0,91	0,95	0,90	0,92	5,43		15,12	15,79	14,96	15,29	1+2
20	0,70	0,75	0,71	0,72	5,56		19,39	20,78	19,67	19,95	1+4
25	0,76	0,73	0,78	0,76	5,48		25,26	24,27	25,93	25,15	1+5

Tabelle 1

Aufstellung des Eichfaktors für Ausscheidungsprodukt II

Harnkonzentration in mg%	$\Delta \varepsilon$ der Proben			Mittelwert	Eichfaktor	Mittelwert Eichfaktor	Mit Eichfaktor ermittelte Konzentration			Mittelwert der Verdünnung der Meßlösung
	Nr.1	Nr.2	Nr.3				Nr.1	Nr.2	Nr.3	
1	0,16	0,12	0,13	0,14	7,14		1,09	0,82	0,89	0,93
2	0,33	0,27	0,28	0,29	6,89		2,25	1,84	1,91	2,00
3	0,43	0,45	0,48	0,45	6,67		2,93	3,07	3,27	2,91
5	0,72	0,75	0,77	0,75	6,67	6,82	4,91	5,11	5,25	5,09
10	0,73	0,76	0,74	0,74	6,76		9,82	10,37	10,09	10,09
15	0,75	0,75	0,72	0,74	6,76		15,35	15,35	14,73	15,14
20	0,74	0,73	0,74	0,74	6,76		20,19	19,91	20,19	20,09
25	0,72	0,71	0,73	0,72	6,94		24,55	24,21	24,89	24,55

- 22 -

Tabelle 2

Aufstellung des Eichfaktors für Ausscheidungsprodukt III

Harnkonzentration in mg%	ΔE der Proben		Mittelwert	Eichfaktor	Mittelwert Eichfaktor	Mit Eichfaktor ermittelte Konzentration		Mittelwert	Verdünnung der Meßlösung
	Nr.1	Nr.2	Nr.3			Nr.1	Nr.2	Nr.3	
1	0,10	0,16	0,12	0,13	7,69	0,78	1,25	0,94	0,99
2	0,27	0,28	0,23	0,26	7,69	2,11	2,19	1,80	2,03
3	0,41	0,36	0,38	0,38	7,89	3,20	2,81	2,97	2,99
5	0,60	0,66	0,64	0,63	7,93	4,69	5,16	5,00	4,95
10	0,61	0,65	0,64	0,63	7,93	9,54	10,16	10,01	9,90
15	0,98	0,96	0,93	0,96	7,81	15,32	15,01	14,55	14,96
20	0,62	0,66	0,64	0,64	7,81	19,39	20,64	20,01	20,01

Tabelle 3

Aufstellung des Eichfaktors für Ausscheidungsprodukt IV

Harnkonzentration in mg%	ΔF der Proben			Mittelwert	Eichfaktor	Mittelwert Eichfaktor	Mit Eichfaktor ermittelte Konzentration			Mittelwert der Verdünnung der Meßlösung
	Nr.1	Nr.2	Nr.3				Nr.1	Nr.2	Nr.3	
0,1	0,17	0,14	0,15	0,15	0,67		0,11	0,09	0,10	0,10
0,2	0,32	0,29	0,33	0,31	0,65	0,65	0,21	0,19	0,21	0,21
0,3	0,48	0,47	0,44	0,46	0,65		0,31	0,31	0,29	0,31
0,5	0,83	0,79	0,81	0,81	0,62		0,54	0,51	0,53	0,53

- 24 -

Tabelle 4

Aufstellung des Eichfaktors für Ausscheidungsprodukt I

4.5. Ergebnisse

Bei sieben Personen wurde der Ausscheidungsverlauf nach Aufnahme von 200 bzw. 400 mg Heptabarbital bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 - 11 zusammengefaßt. In einem zweiten Versuch wurde nach der Aufnahme von Heptabarbital nur jeweils die Gesamtmenge der einzelnen renalen Ausscheidungsprodukte im Sammelharn bestimmt. Von diesen fünf Personen hatten zwei am ersten Versuch auch teilgenommen. Zwischen den beiden Aufnahmen lag ein Zeitraum von mindestens sechs Monaten. Die Ergebnisse des zweiten Versuches sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die Verteilung der einzelnen Stoffwechselprodukte bei der Gesamtausscheidung bei allen Versuchen ist nach Aufnahme von 200 mg in Abbildung 4 und nach Aufnahme von 400 mg in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Bei acht Personen (A, C, D, E, F, G, I, K) wurden die einzelnen Stoffwechselprodukte etwa im Verhältnis II : III : IV wie 2 : 2 : 1 ausgeschieden. Die insgesamt ausgeschiedene Barbituratmenge lag zwischen 32 % und 60 % bezogen auf die aufgenommene Menge. Die Hälfte davon erschien innerhalb der ersten 12 Stunden. Nur 0,9 - 2,1 % wurden unverändert ausgeschieden.

Bei einer Versuchsperson (H) erschienen alle Stoffwechselprodukte zu etwa gleichen Teilen (1:1:1). Versuchsperson B (B') zeigte dagegen ein völlig anderes Ausscheidungsmuster. Hier war der Anteil an IV am höchsten und II am niedrigsten. Die Gesamtausscheidung lag mit 25 % deutlich unter den Werten der anderen Personen. Beim zweiten Versuch ergaben sich entsprechende Werte.

Tabelle 5

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson A

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 200 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
07.10	225	6,0	12,6	9,0	3,9	25,5
13.15	160	6,1	8,5	7,3	3,0	18,8
15.45	145	6,0	3,5	3,2	1,4	8,1
19.00	220	6,1	5,0	4,9	1,9	11,8
23.00	190	5,9	4,7	4,8	1,0	10,5
07.30	250	5,5	4,5	4,7	1,1	10,3
12.30	180	6,1	+	+	-	
Summe			33,8	33,9	12,3	85,0 mg
% bezogen auf Aufnahme			16,3	15,9	5,8	38,0 %

unverändert ausgeschieden: 3,5 mg = 0,9 % Heptabarbital

Tabelle 6

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson B

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht weiblich

Aufnahmemenge: 200 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
09.00	320	6,5	3,3	6,6	12,1	20,0
11.00	220	6,1	1,1	2,5	3,5	7,1
12.00	60	6,1	0,6	1,0	1,5	3,1
15.30	230	5,5	1,9	3,8	2,7	8,4
18.00	110	6,0	0,5	0,9	1,0	2,4
20.15	100	5,7	+	+	+	-
22.40	360	5,4	-	-	-	-
Summe			7,4	14,8	20,8	43,0 mg
% bezogen auf Aufnahme			3,6	6,9	9,8	20,3 %

unverändert ausgeschieden: 10,8 mg = 5,4 % Heptabarbital

Tabelle 7

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson C

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 200 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
08.30	310	5,6	16,5	13,5	5,1	35,1
12.10	180	6,1	5,2	5,3	2,4	12,9
15.55	185	6,1	7,2	5,4	2,0	14,6
18.00	210	6,5	3,5	2,3	1,5	7,3
23.00	180	6,0	6,2	4,1	3,1	13,4
08.15	280	5,4	3,2	2,9	2,0	8,1
10.20	210	5,8	+	++	+	
Summe			41,8	33,5	16,1	91,4 mg
% bezogen auf Aufnahme			20,2	16,4	7,6	44,2 %

unverändert ausgeschieden: 3,3 mg = 1,6 % Heptabarbital

Tabelle 8

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson D

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 400 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
10.00	180	5,5	45,0	29,0	19,6	93,6
12.55	95	6,0	8,4	7,6	2,4	18,4
15.00	85	6,6	4,6	5,8	1,8	12,2
17.30	150	6,5	3,6	3,6	1,9	9,1
20.45	80	5,0	2,8	3,0	2,6	8,4
23.00	40	5,1	3,6	5,7	4,7	14,0
08.30	180	5,6	13,0	17,5	4,9	35,4
11.15	120	6,3	1,6	2,7	1,4	5,7
14.30	150	7,0	+	++	+	
17.30	75	5,6	-	+	-	
Summe			82,6	74,9	39,3	196,8 mg
% bezogen auf Aufnahme			19,9	17,6	9,2	46,7 %

unverändert ausgeschieden: 8,3 mg = 2,1 % Heptabarbital

Tabelle 9

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson E

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 400 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
08.30	270	5,3	20,1	16,8	10,2	47,1
10.15	200	5,9	21,3	17,6	11,4	50,3
14.00	210	7,0	20,4	21,3	10,8	52,5
16.00	220	6,3	14,3	16,4	9,7	40,4
19.15	190	6,5	7,9	8,4	5,0	21,3
07.30	350	5,8	3,4	4,7	2,1	10,2
12.15	180	6,4	0,6	0,8	0,8	2,2
15.30	210	6,8	+	+	+	
Summe			88,0	86,0	50,0	224,0 mg
% bezogen auf Aufnahme			21,2	20,2	11,7	53,1 %

unverändert ausgeschieden : 5,5 mg = 1,4 % Heptabarbital

Tabelle 10

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson F

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 400 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
08.00	210	5,6	35,0	29,6	16,8	81,4
09.30	40	6,1	9,1	8,8	5,2	23,1
16.00	180	6,0	29,6	34,7	13,5	77,8
18.00	80	6,6	2,9	2,5	1,0	6,4
20.00	75	5,8	3,6	4,6	1,4	9,6
22.30	170	5,9	4,8	5,8	2,0	12,6
08.00	220	5,5	10,9	10,9	11,7	33,5
13.00	170	6,2	0,9	1,4	0,8	3,1
17.15	95	7,0	+	++	-	
Summe			96,8	98,3	52,4	247,5 mg
% bezogen auf Aufnahme			23,3	23,1	12,3	58,7 %

unverändert ausgeschieden: 8,4 mg = 2,1 % Heptabarbital

Tabelle 11

Ausscheidungsverlauf der Heptabarbital-Stoffwechselprodukte

Versuchsperson G

Aufnahme: 22.00 Uhr

Geschlecht männlich

Aufnahmemenge: 400 mg

Uhrzeit	Harnmenge ml	pH	Stoffwechselprodukt mg			Summe mg
			II	III	IV	
07.30	240	5,7	26,1	20,9	14,2	61,2
10.00	110	5,7	8,2	7,2	4,9	20,3
12.15	95	5,9	8,2	8,3	5,0	21,5
16.30	175	6,1	9,3	9,1	6,4	24,8
19.40	210	5,8	4,4	6,5	3,5	14,4
21.30	220	7,1	4,2	4,3	2,0	10,5
07.00	250	5,8	10,0	10,6	9,4	30,0
11.15	210	6,2	1,8	1,7	1,7	5,2
15.45	180	6,5	0,7	1,1	0,6	2,4
17.00	110	6,1	0,5	0,6	0,5	1,6
20.15	130	6,1	+	+	+	
Summe			73,4	70,3	48,2	191,9 mg
% bezogen auf Aufnahme			17,7	16,5	11,3	45,5 %

unverändert ausgeschieden: 5,0 mg = 1,2 % Heptabarbital

Versuchs- person	Heptabarbital Dosis	Stoffwechselprodukt								Summe	unverändert	
		II		III		IV						
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%			
B'	weiblich	200 mg	10,7	5,2	16,3	7,6	21,1	9,9	48,1	22,8	2,0	1
H	männlich	200 mg	33,6	16,2	32,1	15,1	30,7	14,4	96,4	45,7	2,1	1
G'	männlich	400 mg	70,1	16,9	71,4	16,8	40,0	9,4	181,5	43,1	3,5	0,7
I	weiblich	400 mg	69,2	16,7	72,1	16,9	43,4	10,2	184,7	43,8	4,8	1,2
K	männlich	400 mg	58,8	14,2	56,6	13,5	36,9	8,7	152,3	36,4	5,2	1,3

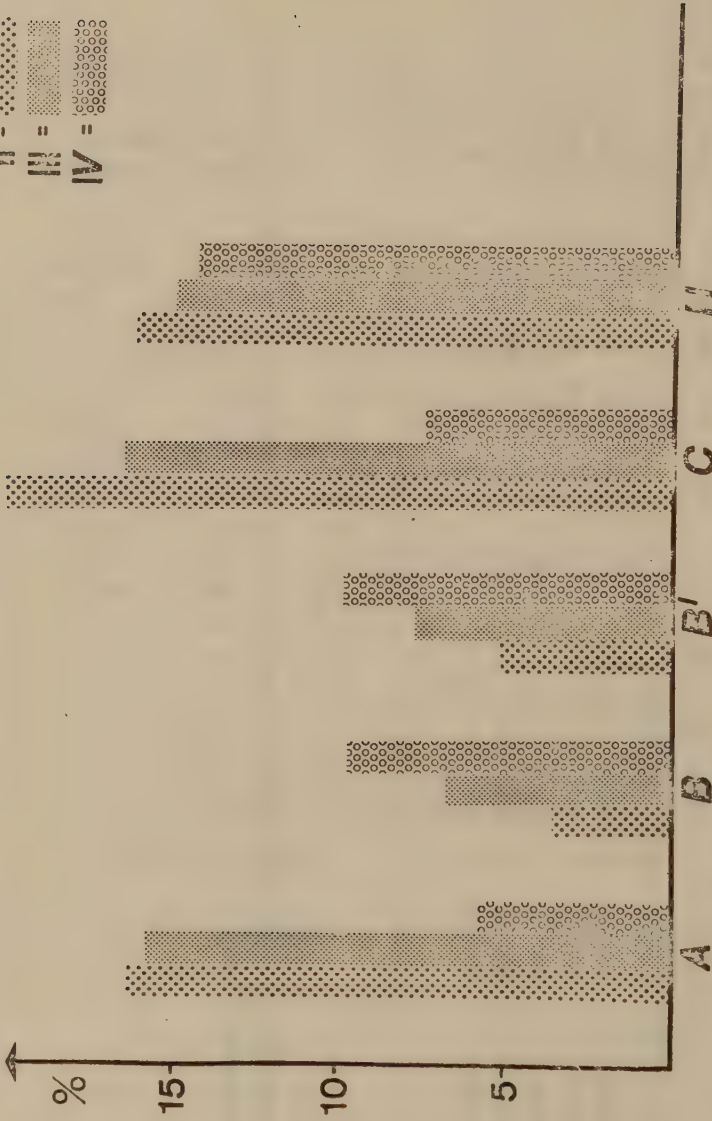
1
3
3
1

Tabelle 12

Ausscheidungsgesamt mengen im 36 Stunden Sammelharn nach Aufnahme von Heptabarbital in mg bzw. % der aufgenommenen Menge.

ausgeschiedenes Stoffwechselprodukt

III = 
III = 
IV = 



VERSUCHSPERSONEN

Abbildung 4

Gesamtausscheidung der Stoffwechselprodukte II, III und IV in % bezogen auf die aufgenommene Menge (200 mg).

II =
III =
IV =

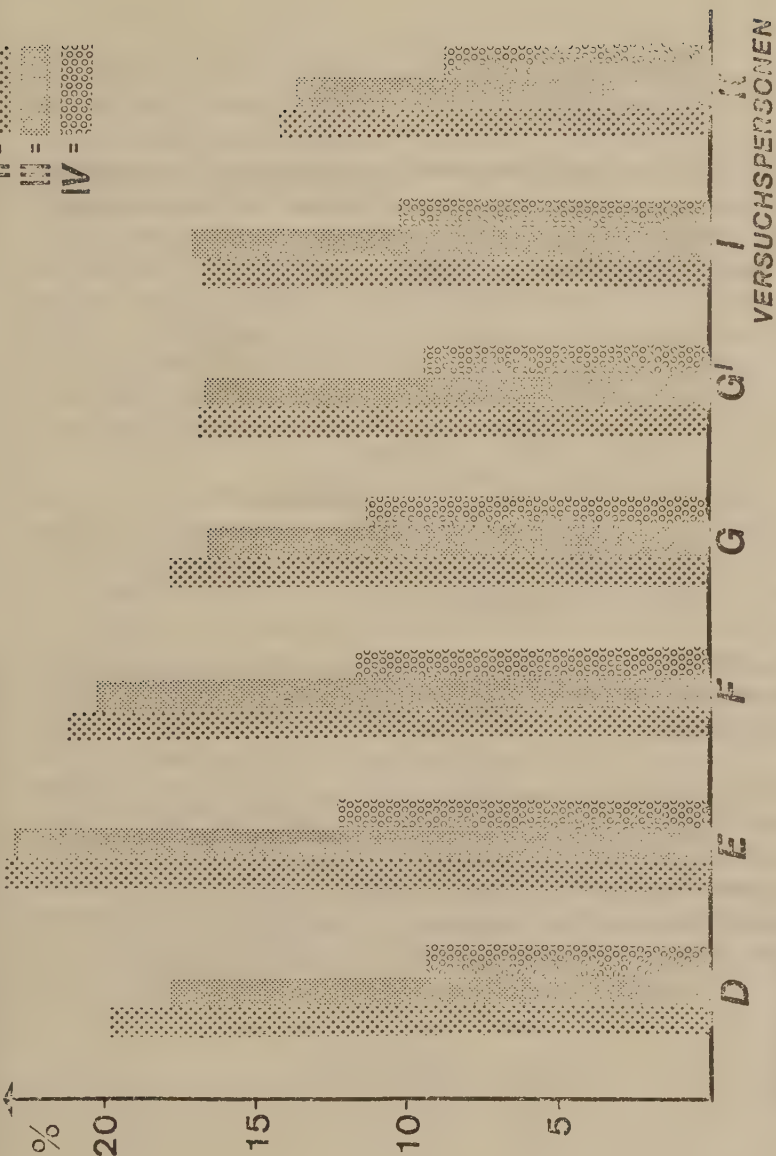


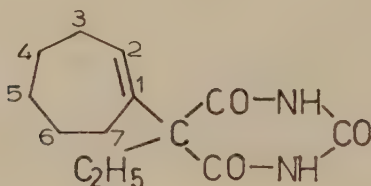
Abbildung 5

Gesamtausscheidung der Stoffwechselprodukte II, III und IV in % bezogen auf die aufgenommene Menge (400 mg).

5. Synthesen

5.1. Synthesewege

Nach den bisher bei Barbituraten beobachteten Stoffwechselveränderungen (siehe Kapitel 2.), schien für Heptabarbital eine Oxidation in 3- und in 7-Stellung am Cycloheptenring am wahrscheinlichsten zu sein:



Heptabarbital

Es wurde daher versucht, die entsprechenden Verbindungen synthetisch darzustellen und mit den Stoffwechselprodukten zu vergleichen.

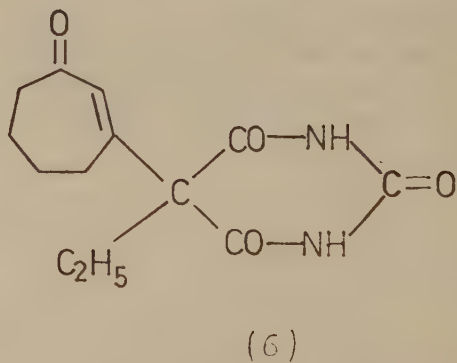
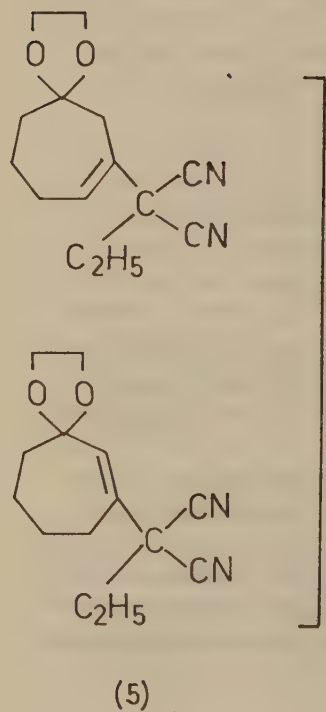
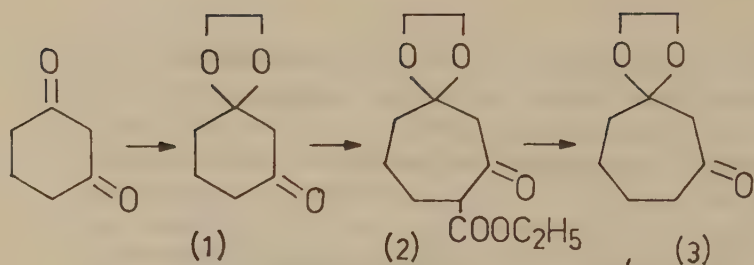
Barbiturate mit unsymmetrischen Substituenten am C⁽⁵⁾ werden meist durch Kondensation der entsprechenden Cyanessigesterderivate mit Harnstoff dargestellt (COPE⁸⁾). Die entstehenden 6-Iminodihydrouracile lassen sich mit starken Säuren zu den gewünschten Barbitursäuren hydrolysieren. Der erste Substituent wird dabei durch

eine Knoevenagel-Kondensation ²²⁾ des Cyanessigesters mit dem entsprechenden Aldehyd oder Keton (ALEXANDER, COPE ¹⁾) - evtl. unter gleichzeitiger Reduktion - eingeführt, der zweite durch Alkylierung mit dem entsprechenden Halogen-derivat.

Auf die gleiche Weise gelang es, das 3-oxo-Derivat herzustellen (Formelschema I). Bei der Knoevenagel-Kondensation wurde als Katalysator schwach basischer Ionenaustauscher verwendet (HEIN et al. ²¹⁾). Statt Cyanessigester wurde das reaktionsfähigere Malodinitril eingesetzt, da Cyanessigester nicht mehr reagierte.

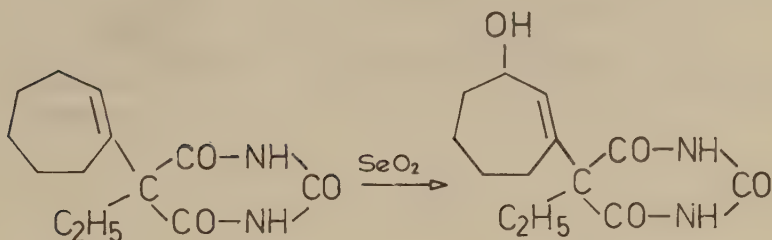
Die möglichen Zwischenprodukte (5) konnten nicht isoliert werden. Sie verharzten an der Luft sehr schnell zu einer in organischen Lösungsmitteln schwer löslichen braunen Masse. (Bei dem Versuch sie im Vakuum zu destillieren entstand beim Erhitzen schlagartig ein zinnoberrotes, nicht mehr in Lösung zu bringendes Produkt). Das Rohprodukt wurde daher sofort mit Harnstoff kondensiert und anschließend mit Schwefelsäure die Imino-Gruppen und das Ketal hydrolisiert. Es entstand in sehr geringer Ausbeute das gewünschte Produkt (6). Das mögliche Isomere trat nicht auf. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß es sich bei der Hydrolyse in die gewünschte Form umlagert.

Es gelang nicht, das 3-Hydroxy-Derivat durch Alkylierung von Äthylmalonsäurediäthylester oder Äthylcyanessigsäureäthylester mit 1-Brom-3-acetoxycyclohept-1-en herzustellen. Ebenso gelang es nicht, das 7-Hydroxy-Derivat durch Alkylierung von



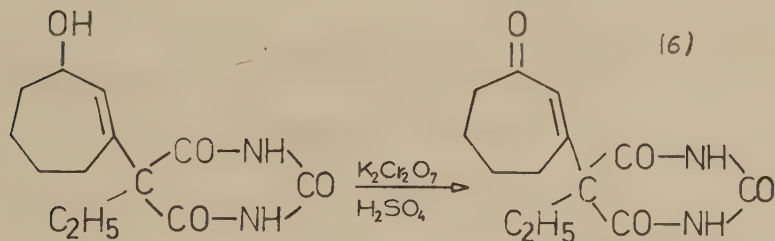
Formelschema I

2-Acetoxycycloheptylidenmalodinitril mit Äthylbromid zu gewinnen. In beiden Fällen scheint die Alkylierung nur am Siebenring stattzufinden. Diese Reaktion dürfte auch für die schlechte Ausbeute bei der Darstellung des 3-oxo-Derivates verantwortlich sein. Die Darstellung des 3-Hydroxy-Derivates gelang schließlich durch selektive Oxidation des Heptabarbitals mit Selendioxid (Formelschema II).

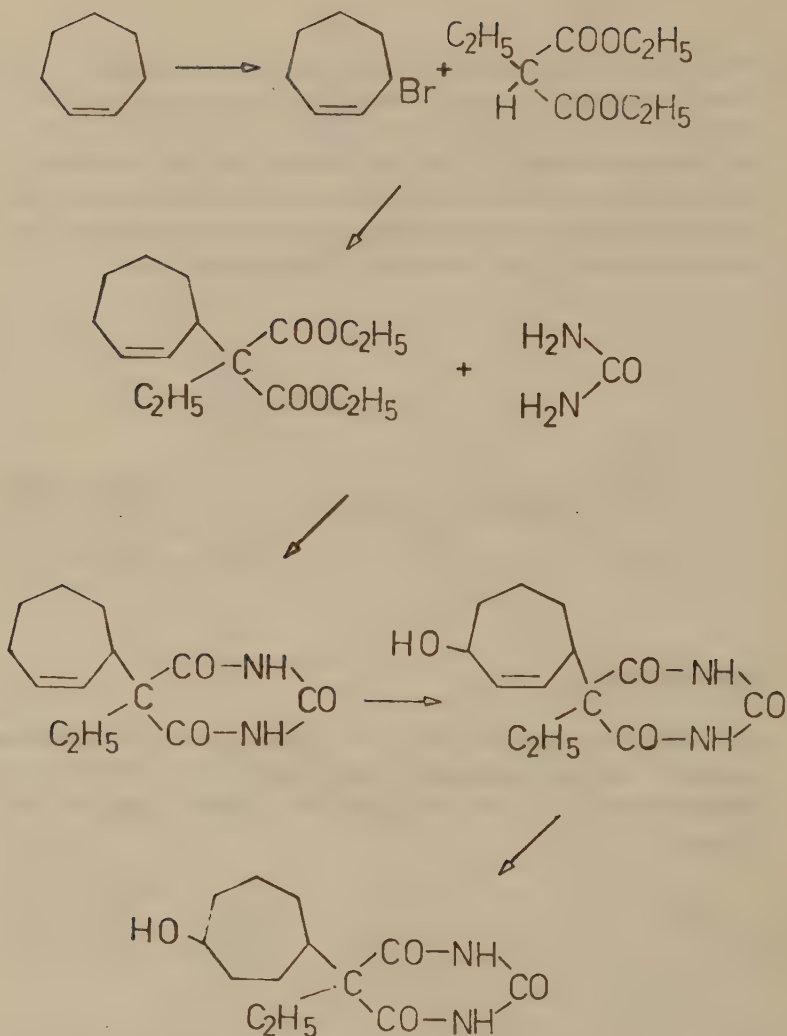


Formelschema II

Dieses konnte durch Oxidation mit K₂Cr₂O₇/H₂SO₄ im Zweiphasensystem³³⁾ zu dem entsprechenden 3-oxo-Derivat oxidiert werden (Formelschema III). Die Stellung der beiden Gruppen war so gesichert.

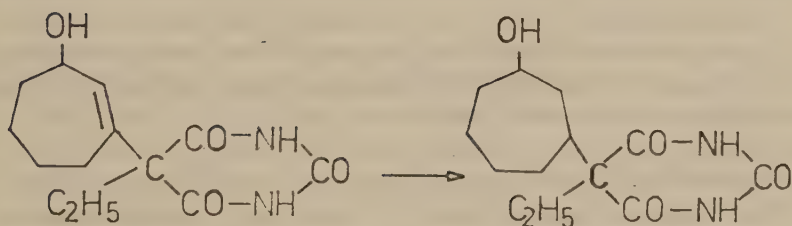


Formelschema III



Formelschema IV

Auf Grund der NMR-Spektren (Kapitel 6) mußte für das Ausscheidungsprodukt IV eine OH-Gruppe in 5- oder 6-Stellung des Siebenringes angenommen werden. Ausgangsverbindungen, die eine Synthese der entsprechenden Barbiturate ermöglicht hätten, sind in der Literatur nicht beschrieben. Wege sie herzustellen wurden nicht gefunden. Es wurde daher versucht, den Beweis der Stellung der OH-Gruppe indirekt zu führen. Dazu wurde das Stoffwechselprodukt IV vom Cyclohepten- zum Cycloheptan-Derivat hydriert. Das der 5-Stellung entsprechende Produkt wurde nach Formelschema IV synthetisiert. Das der 6-Stellung entsprechende Produkt erhielt man durch Hydrieren des nach Kapitel 5.2.2. hergestellten 3-Hydroxy-Derivates (Formelschema V).



Formelschema V

5.2. Arbeitsvorschriften

5.2.1. Synthese der 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohepten-1-yl)
barbitursäure

5.2.1.1. Cyclohexan-1,3-dionmonoäthylenketal

250 g stabilisiertes Cyclohexan-1,3-dion (entsprechend ca. 190 g reinem Cyclohexan-1,3-dion (1,7 Mol) mit gesättigter NaCl-Lösung stabilisiert) wurden in 2 l Benzol am Wasserabscheider so lange unter Rückfluß gekocht, bis kein Wasser mehr überging (ca. 50 ml). Das Diketon ging unter Braunfärbung in Lösung, abgeschiedenes NaCl störte die weitere Umsetzung nicht. Nun gab man 105 g (1,7 Mol) Äthylenglykol und ca. 0,5 g p-Toluolsulfonsäure hinzu und erhitze weiter, bis nach etwa 45 Minuten erneut reichlich 30 ml Wasser abgeschieden waren.

Dann wurde rasch abgekühlt, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung entsäuert, mit CaCl_2 getrocknet und das Benzol abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum destilliert. Bei $108 - 109^\circ / 4$ Torr ging rohes Ketal über. Gegen Ende der Destillation stieg die Temperatur auf $120 - 130^\circ$ und der Kühler verstopfte durch auskristallisierendes Diketal.

Das Destillat wurde einige Tage im Kühlschrank stehengelassen, wobei sich noch etwas Diketal in Form langer Nadeln ausschied, die abgesaugt wurden. Bei erneuter Destillation über eine 15 cm Vigreux-Kolonne zeigte das Monoketal einen Sdp. $92,5 / 2$ Torr (Lit.¹³⁾, Sdp. $77-79^\circ / 0,3$ Torr). Die Ausbeute betrug 110 g (43 % d. Th.).

5.2.1.2. 3,3-Äthylendioxy-7-carbäthoxy-cycloheptan-1-on

In einem mit Rührer und Rückfluß versehenen 2-l-Dreihals-Kolben wurden 110 g Monoketal mit 350 ml absolutem Äther und 100 g trockenem Diazoessigsäureäthylester vermischt. Man erwärmte eben bis zum Sieden, entfernte das Heizbad und gab in kleinen Portionen insgesamt 108 g wasserfreies ZnCl_2 hinzu. Mit der Zugabe wurde jeweils gewartet, bis die eintretende stürmische N_2 -Entwicklung aufhörte, aber der Äther noch am Sieden blieb. Das Zinkchlorid ging zunächst in Lösung und danach begann sich das entstehende Zinkchelat des Ringerweiterungsproduktes abzuscheiden. Nach 3 - 4 Stunden war die Reaktion beendet, wobei sich das Gemisch ockergelb gefärbt hatte. Man gab unter Rühren 150 g Eisschnee hinzu. Die abgeschiedenen weißen Flocken wurden durch Zugabe von etwas Eisessig wieder aufgelöst. Sobald sich nach Abstellen des Rührers zwei klare Schichten gebildet hatten, trennte man die wässrige Schicht ab, entsäuerte die schwach rosa gefärbte Ätherschicht durch Waschen mit NaHCO_3 -Lösung und dampfte nach Trocknen mit CaCl_2 den Äther ab.

Der ölige Rückstand lieferte bei der fraktionierten Destillation über eine 15 cm Vigreux-Kolonne 40 g Chloressigsäureäthylester, 10 g unverändertes Ketal und 71 g (49 %, bzw. auf umgesetztes Ketal (Lit.¹³⁾ 53 %) 3,3-Äthylendioxy-7-carbäthoxy-cycloheptan-1-on.

Sdp. $145-150^\circ$ / 4 Torr (Lit.¹³⁾ $170-180^\circ$ / 10 Torr).

5.2.1.3. Cycloheptan-1,3-dion-monoäthylenketal

71 g 3,3-Äthylendioxy-7-carbäthoxy-cycloheptan-1-on wurden mit 50 g KOH in 700 ml Wasser unter Rühren 10 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung färbte sich dabei hellgelb. Dann wurde abgekühlt und 6 Stunden mit Äther perforiert. Die Ätherphase wurde mit CaCl_2 getrocknet und der Äther abgedampft. Der ölige Rückstand ging fast vollständig bei $105 - 106^\circ$ / 2 Torr über: 24 g (49 % d. Th.). Cycloheptan-1,3-dion-monoäthylenketal ist ein farbloses, viskoses Öl.

5.2.1.4. 3,3-Äthylendioxyheptyliden-malodinitril

Vorbereitung des schwach basischen Ionenaustauschers:

Es wurden die beiden schwach basischen Ionenaustauscher Dowex 3 (Firma Carl Roth OHG, Karlsruhe) und Amberlite Type IR - 45 (Firma Serva, Heidelberg) mit gleichem Erfolg eingesetzt. Dowex 3 lag bereits in der OH^- -Form vor. Amberlite, das in der Cl^- -Form vorlag, wurde zunächst in die OH^- -Form umgewandelt. Dazu wurden 100 g Ionenaustauscher so lange mit 2 n Natronlauge in einem Elutionsrohr gewaschen, bis in der abfließenden Lauge kein Chlorid mehr nachweisbar war. Dann wurde bis zur neutralen Reaktion mit destilliertem Wasser gespült.

Anschließend wurde mit Acetat beladen. Dazu wurden je 100 g der beiden Ionenaustauscher mit je 1,5 l 10 % Essigsäure in einem Chromatographierrohr mit einer Durchflußgeschwindigkeit von etwa 1 l pro Stunde durchspült. Anschließend wurde bis zur neutralen

Reaktion mit destilliertem Wasser nachgespült. Die beiden Ionenaustauscher wurden dann im Trockenschrank bei $70-80^{\circ}$ vorsichtig 12 Stunden getrocknet und in verschlossenen Gefäßen im Exikator über CaCl_2 bis zum Gebrauch aufbewahrt.

5 g schwach basischer Ionenaustauscher wurden in einem 250 ml Kolben mit Wasserabscheider mit 150 ml Benzol unter Rückfluß so lange gekocht, bis sich kein Wasser mehr abschied (ca. 0,5 ml). Dann wurden 24 g Cycloheptan-1,3-dion-monoäthylenketal (141 mMol) und 10,5 g Malonsäuredinitril (141 mMol) zugefügt und weiter erhitzt, bis keine erneute Wasserabscheidung mehr zu beobachten war (ca. 4 Stunden). Da sich der Ionenaustauscher dunkelrot verfärbt hatte, wurde er abfiltriert, mit etwas Benzol nachgewaschen, die Filtrate vereinigt und die Reaktion mit 5 g frischen Ionenaustauscher fortgesetzt. Dies wurde im Verlauf von 12 Stunden insgesamt dreimal wiederholt. Dann war keine Wasserneubildung mehr zu beobachten. Insgesamt wurden (abzüglich der Menge aus dem Ionenaustauscher) 1,1 ml Wasser abgeschieden. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert, mit etwas Benzol nachgewaschen, die Filtrate vereinigt und das Benzol abdestilliert. Der braune ölige Rückstand ergab nach fraktionierter Destillation über eine 15 cm Vigreux-Kolonne 5 g unverändertes Ketal, etwas unverändertes Malodinitril und bei $153^{\circ} / 2 \text{ Torr}$ 10 g 3,3-Äthylendioxyheptyliden-malodinitril. Die Substanz kristallisierte im Kühlschranks im Verlauf von 12 Stunden. Schmp. $56-57^{\circ}$.

5.2.1.5. 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure

10 g 3,3-Äthylendioxyheptyliden-malondinitril (44 mMol) und 5,5 g (50 mMol) Äthylbromid wurden in einem 100 ml Zweihals-Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Magnet-rührer bis eben zum Sieden erwärmt. Dann wurde eine Lösung von 1 g Natrium (44 mMol) in 25 ml absolutem Äthanol im Laufe ei-ner halben Stunde unter Rühren zugetropft. Danach wurde noch 3 Stunden weitergerührt, der Alkohol im schwachen Vakuum abge-zogen und so viel Eiswasser zugesetzt, daß sich das abgeschie-dene Salz eben wieder löste. Darauf wurde dreimal mit Äther ex-trahiert, der Äther mit CaCl_2 getrocknet und im Vakuum abge-zogen. Zurück blieben 11 g einer rotbraunen öligen Substanz, die wegen der obengenannten Schwierigkeiten bei der weiteren Aufarbeitung direkt zum Ringschluß mit Harnstoff eingesetzt wurden.

Dazu wurden die 11 g des Zwischenproduktes mit 5,3 g Harnstoff (88 mMol) und einer Lösung von 2 g Natrium (88 mMol) in 45 ml Äthanol 8 Stunden unter Rühren bei 80° auf dem Wasserbad er-wärmt. Danach wurde der Alkohol abgedampft und der Rückstand mit 100 ml 25 %iger Schwefelsäure 2 Stunden gekocht. Um ent-standenes Barbiturat in Lösung zu halten, wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und ölige Nebenprodukte mit Äther extra-hiert. Darauf wurde mit Schwefelsäure wieder angesäuert und dreimal mit je 200 ml Äther extrahiert, der Äther mit CaCl_2 getrocknet und abgedampft. Als Rückstand blieben ca. 500 mg einer braunen schmierigen Masse. Diese wurde in 4 ml Äthanol

gelöst und Anteile von 20 μ l auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen, die in Äther entwickelt wurde. Als Vergleich wurden das aus Harn isolierte Keto-Stoffwechselprodukt des Heptabarbitals und Heptabarbital aufgetragen. Beim Besprühen mit gesättigter Quecksilber(I)-nitrat-Lösung färbte sich eine Fraktion mit dem hRf-Wert 60 schwarz an. Gleichen hRf-Wert zeigte auch das mit aufgetragene Stoffwechselprodukt des Heptabarbitals. Beim Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung färbte sich die gleiche Fraktion gelb an. Dies sprach für das Vorliegen einer Keto-Verbindung.

Die Substanz wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert. Hierzu wurden Anteile von 0,2 ml der Äthanol-Lösung strichförmig auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen, die zweimal in Äther entwickelt wurden. Die Fraktion wurde durch Besprühen eines schmalen Randstreifens mit Quecksilber(I)-nitrat bestimmt, der Verlauf durch Fluoreszenzlösung unter UV-Licht verfolgt und gekennzeichnet, dann ausgekratzt und in einem Chromatographierohr mit Äther eluiert. Nach Abdampfen des Äthers erhielt man eine weiße kristalline Substanz, die nochmals mit wenig Äther umkristallisiert wurde. Ausbeute 5 mg.

Schmp.: 232°C, hRf-Wert (Äther): 60

5.2.2. 5-Äthyl-5-(3-Hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure

In einem mit Rückflußkühler und Magnetrührer versehenen 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden 25 g (0,1 Mol) Heptabarbital und 11,1 g (0,1 Mol) Selendioxid, gelöst in 180 ml Dioxan und 12 ml H₂O, gegeben und unter kräftigem Rühren 8 Stunden zum Sieden erhitzt. Dann wurde das abgeschiedene Selen noch heiß abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand, der durch Selen rotbraun gefärbt war, enthielt Heptabarbital und das 3-Hydroxyderivat im Verhältnis 9:1. Die Ausbeute ließ sich durch erhöhten Selendioxidzusatz und längeres Kochen nicht verbessern.

Die Reinigung und Abtrennung von nicht umgesetztem Heptabarbital erfolgte dünnschichtchromatographisch. Dazu wurden Anteile des Rückstandes in Äthanol gelöst und strichförmig auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und in Äther entwickelt. Die in Frage kommende Fraktion wurde durch Besprühen eines schmalen Randstreifens mit Quecksilber-I-nitrat-Lösung identifiziert, abgehoben und mit Äther eluiert. Der schwach gelb gefärbte Äther wurde mit Aktivkohle versetzt, filtriert und am Rotationsverdampfer abdestilliert. Zurück blieb eine klare, glasige Masse, die im Trockenschrank bei 120°C durchkristallisierte.

Schmp.: 179°C, hRf-Wert (Äther) : 50

5.2.3. 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure

100 mg (0,42 mMol) der nach Kapitel 5.2.2. hergestellten 5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure wurden in 50 ml Äther gelöst und in einen 200 ml Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer gegeben. Hierzu wurde im Verlauf einer Viertelstunde eine Lösung von 41,4 mg (0,14 mMol) $K_2Cr_2O_7$ in 50 ml 15 %iger Schwefelsäure zugetropft. Dann wurde noch 2 Stunden weitergerührt. Die wäßrige Phase färbte sich dabei grün. Sie wurde abgetrennt noch zweimal mit je 100 ml Äther extrahiert, die Ätherphasen vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther abgedampft. Zurück blieben 72 mg (72,6 % d.Th.) weiße kristalline Substanz von 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure.

Schmp.: $232^{\circ}C$, hRf-Wert (Äther): 60

5.2.4. 5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure

5.2.4.1. Cyclohept-2-en-1-yl-bromid

Eine Mischung von 30 g Cyclohepten (0,31 Mol), 55,5 g N-Bromsuccinimid (0,31 Mol) und 30 mg Azoisobuttersäuredinitril in 200 ml Tetrachlorkohlenstoff wurden am Rückfluß erhitzt, bis die exotherme Reaktion einsetzte. Dann wurde bis zum Abklingen der Reaktion die Wärmezufuhr unterbrochen, danach nochmals für 15 Minuten erhitzt. Das Succinimid wurde abgesaugt, der Tetrachlorkohlenstoff mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde über eine 15 cm Vigreux-Kolonne im Vakuum destilliert. Cyclohept-2-en-1-yl-bromid ging bei $67^{\circ} / 8$ Torr (Lit.⁹⁾ $59^{\circ} / 5,2$ Torr) über.

Ausbeute: 28 g (51 % d. Th., Lit.⁹⁾ 55 %).

5.2.4.2. Äthyl-(cyclohept-2-en-1-yl)malonsäurediäthylester

17,5 g Cyclohept-2-en-1-yl-bromid (0,1 Mol) und 18,8 g Äthyl-malonsäurediäthylester (0,1 Mol) wurden in einem 200 ml Zweihals-Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Magnetrührer auf etwa 60°C erwärmt. Dann wurde unter Rühren eine Lösung von 2,3 g Natrium (0,1 Mol) in 50 ml absolutem Äthanol im Laufe einer halben Stunde zugetropft. Danach wurde noch 3 Stunden weitergerührt, der Alkohol am Rotationsverdampfer abdestilliert und soviel Eiswasser zugesetzt, daß sich das abgeschiedene Salz eben wieder löste. Dann wurde dreimal mit der doppelten Menge Äther extrahiert, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum über eine 15 cm Vigreux-Kolonnen destilliert. Äthyl-(cyclohept-2-en-1-yl)malonsäurediäthylester ging bei 143° / 2 Torr über.

Ausbeute: 15,5 g (55 % d.Th.).

5.2.4.3. 5-Äthyl-5-(cyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure

Zu 15,5 g Äthyl-(cyclohept-2-en-1-yl)malonsäurediäthylester (55 mMol) wurden eine Lösung von 2,53 g Natrium (110 mMol) in 55 ml absolutem Äthanol gegeben und 6,6 g Harnstoff (110 mMol) zugefügt. Diese Lösung wurde 8 Stunden auf dem Wasserbad auf 80°C erwärmt. Hierauf wurde der Alkohol am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in kaltem Wasser aufgelöst. Die Lösung wurde mit 2 n Salzsäure angesäuert und der Niederschlag abgesaugt. Nach dem Umkristallisieren aus reichlich Wasser erhielt man 5-Äthyl-5-(cyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure in Form dünner Kristallplättchen.

Schmp.: 176°C, Ausbeute: 8 g (58 % d.Th.).

5.2.4.4. 5-Äthyl-5-(4-hydroxycyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure

2,5 g 5-Äthyl-5-(cyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure (10 mMol) und 1,1 g Selendioxid (10 mMol) wurden entsprechend der Vorschrift Kapitel 5.2.2. umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt eine gläserige Substanz, die ab 80°C zerfloß. Erst im Laufe von 3 Monaten kristallisierte sie.

Ausbeute: 250 mg, Schmp.: 154-156°C, hRf-Wert (Äther): 45

5.2.4.5. 5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure

Die Hydrierung wurde in der Apparatur Abbildung 6 durchgeführt (ORGANIKUM ³³). Als Katalysator wurde Platin verwendet. Dazu wurde die Substanzbirne mit 25 mg 5-Äthyl-5-(4-hydroxycyclohept-2-en-1-yl)barbitursäure gelöst in 5 ml Eisessig beschickt. In das Reaktionsgefäß kamen 15 ml Eisessig und 5 mg Platinoxid. Dann wurde die Apparatur dreimal evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt. Hahn 3 wurde geöffnet und durch vorsichtiges Öffnen von Hahn 4 soviel Wasser eingelassen, daß sich der Meniskus im Ablesebereich der Bürette befand. Nun wurde der Magnetührer in Gang gesetzt und unter dem Druck der Wassersäule zunächst der Katalysator hydriert bis kein Wasserstoffverbrauch mehr zu beobachten war. Anschließend wurde durch Drehen der Substanzbirne um 180° die Ausgangssubstanz in das Reaktionsgefäß befördert und die Hydrierung fortgesetzt. Es wurde eine Hydrierkurve aufgenommen. Sobald ein Knick auftrat wurde die Hydrierung abgebrochen, da eine längere Hydrierung zur Abspaltung der OH-Gruppe führte. Die Lösung wurde filtriert und der Eisessig am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde in 1 ml Äthanol aufgelöst und dünnschichtchromatographisch gereinigt. Dabei ließen sich neben etwas un-

veränderter Substanz und reichlich 5-Äthyl-5-cycloheptanyl-barbitursäure 8 mg 5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure gewinnen.

Die Substanz war nicht stabil. Sie zersetzte sich beim Erwärmen unter H_2O Abspaltung, so daß kein einheitlicher Schmelzpunkt zu erhalten war.

hRf-Wert (Äther): 38

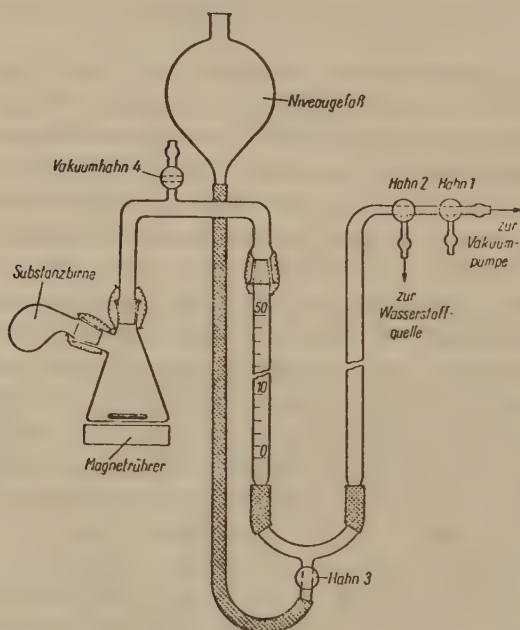


Abbildung 6

Apparatur zur Hydrierung.

5.2.5. 5-Äthyl-5-(3-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure

25 mg 5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure wurde nach der Vorschrift Kapitel 5.2.4.5. hydriert und aufgearbeitet.

Dabei ließen sich neben etwas Acetat-Derivat und reichlich 5-Äthyl-5-(cycloheptan-1-yl)barbitursäure 5 mg 5-Äthyl-5-(3-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure gewinnen. Die Substanz war nicht stabil und zeigte die gleichen Zersetzungerscheinungen wie oben beschrieben.

hRf-Wert (Äther): 45

5.2.6. Hydrierung des Ausscheidungsproduktes IV

20 mg IV wurden nach der Vorschrift Kapitel 5.2.4.5. hydriert und aufgearbeitet.

Dabei ließen sich neben reichlich 5-Äthyl-5-(cycloheptan-1-yl)-barbitursäure 8 mg des hydrierten Ausscheidungsproduktes IV gewinnen. Die Substanz war ebenfalls nicht stabil und zeigte die gleichen Zersetzungerscheinungen wie oben beschrieben.

hRf-Wert (Äther): 38

Auf Verunreinigung mit dem Ausgangsprodukt wurde durch Bromanlagerung an die Doppelbindung geprüft. Dazu wurde das Dünnschichtchromatogramm vor der Entwicklung mit Brom bedampft. Das 1,2-Dibromprodukt zeigte einen wesentlich niedrigeren hRf-Wert von 20.

5.2.7. Derivate der Stoffwechselprodukte des Heptabarbitals

5.2.7.1. Darstellung ³³⁾ des Semicarbazons des Ausscheidungs-
produktes II

1 g Semicarbazidhydrochlorid wurde mit 1 g wasserfreiem Natriumacetat verrieben, mit 10 ml absolutem Äthanol gekocht und heiß filtriert.

Zu 0,5 ml Filtrat wurden 10 mg des Ketons gegeben und 60 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Dann wurde mit soviel Wasser versetzt, daß gerade eine Trübung auftrat und 24 Stunden stehengelassen. Die auskristallisierte Substanz wurde abzentrifugiert und im Vakuum-Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Schmp.: 250°C

5.2.7.2. Darstellung der Essigsäureester der Ausscheidungs-
produkte III und IV

10 mg III wurden in einer Mischung von 0,5 ml Acetanhydrid und 0,1 ml Pyridin gelöst und in einem Reagenzglas 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wurden 10 ml Eiswasser dazugegeben, mit 2 n HCl angesäuert und dreimal mit 20 ml Äther extrahiert. Der Äther wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat auf dem Wasserbad abgedampft. Zurück blieben 8 mg einer glasig spröden Masse, die sich aus Äthanol kristallisieren ließ.

Schmp.: 205-206°C, hRf-Wert (Äther): 65

10 mg IV wurden auf die gleiche Weise umgesetzt. Zurück blieben 6 mg einer glasig spröden Substanz, die sich nicht kristallisieren ließ.

hRf-Wert (Äther): 55

6. Kernresonanz-spektroskopische Untersuchungen

Die NMR-Spektren wurden im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg teils mit der CW-, teils mit der Puls-Fourier-Transform-Technik (PFT) aufgenommen^{*)}. Die Substanzen wurden in wenig d₆-DMSO gelöst und mit CDCl₃ auf das nötige Meßvolumen gebracht. Die PFT-Spektren wurden unter folgenden Bedingungen erhalten:

Puls: 10 - 14 μ sec.

Repetitionszeiten: 5 - 7 sec.

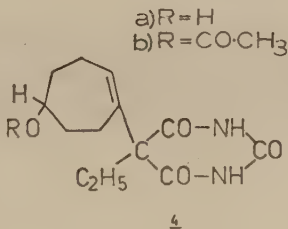
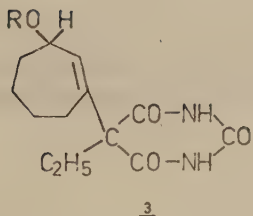
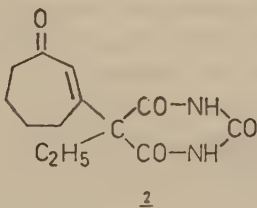
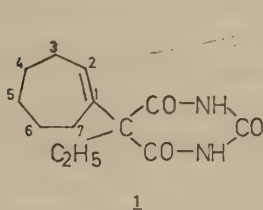
Frequenzbreite: 1250 Hz

Rechner: 20 K Kernspeicher (Texas Instruments 980A),
wovon 16 K Kernspeicher für die Datenaufnahme
zur Verfügung standen.

Akkumulationen: 10 - 100

Interner Lock: Deuteriumsignal von CDCl₃

Diskussion der Spektren



^{*)} siehe Seite 83, NMR

zu 1 (siehe NMR-Spektrum I, Seite 60)

Heptabarbital zeigt für das Olefinproton (C-2) ein Triplett bei 5,95 ppm, für das man bei Entkopplung von den benachbarten Methylenprotonen (Einstrahlung bei $\delta = 2,13$ ppm) ein Singulett erhält.

zu 2 (siehe NMR-Spektrum II, Seite 61)

Die aus dem Harn isolierte Verbindung II stimmte mit der synthetischen (nach Kapitel 5.2.3.) völlig überein. Für das Olefinproton (C-2) erhält man ein Singulett bei 6,07 ppm. C-3 kann daher kein Proton besitzen. Die Verbindung II muß daher die Keto-Gruppe in 3-Stellung besitzen.

zu 3 (siehe NMR-Spektrum III, Seite 62)

Die aus Harn isolierte Verbindung stimmte mit der synthetischen 3a völlig überein. Nach Überführung des aus Harn gewonnenen 3a in die Acetylverbindung 3b wurden Spinentkopplungsversuche (PFT-Technik) durchgeführt.

Bei Entkopplung des Protons an C-3 von den benachbarten Methylenprotonen (Einstrahlung bei $\delta = 1,7$ ppm) erhält man sowohl für das Proton an C-3 als auch für das Olefinproton (C-2) ein Dublett mit $^3J = 3$ Hz. Dies stellt somit einen weiteren Beweis dar, daß das isolierte Produkt die OH-Gruppe in 3-Stellung besitzen muß.

zu 4

Die aus Harn gewonnene Verbindung 4a wurde in die Acetylverbindung 4b überführt (Kapitel 5.3.7.2., Seite 54). Es wurde im Prinzip ein 4a sehr ähnliches Spektrum erhalten.

Da sich 4b auf Grund des günstigeren hRf -Wertes reiner gewinnen ließ, die Aussagen der Spektren von 4a und 4b jedoch gleich sind, sollen hier nur die Spektren der Verbindung 4b besprochen werden.

NMR-Spektrum IV, Seite 63

Im Bereich der Olefinprotonen ist deutlich ein intensives ($\delta = 5,94$ ppm) und ein intensitätsschwaches Triplet bei etwas höherem Feld ($\delta = 5,76$ ppm) zu erkennen. Beide überlagern sich etwas. Es handelt sich demnach um ein Gemisch zweier Barbiturate mit ähnlichen Eigenschaften (Rf -Wert!). In beiden Verbindungen muß das Olefinproton einer Methylen-Gruppe benachbart sein.

Das Methinproton ($\delta = 4,89$ ppm) absorbiert in Form eines Multipletts (7-Linien).

NMR-Spektrum V, -Seite 64

Einstrahlung bei $\delta = 2,27$ ppm, einem Bereich, in dem gewöhnlich einer Doppelbindung benachbarte Methylenprotonen in Cycloolefinen (Cyclohepten) absorbieren, liefert für die in größerer Menge vorhandene Substanz ein Singulett für das Olefinproton und gleichzeitig ein Triplet für das Methinproton. Hieraus folgt, daß die Acetatgruppe an einem C-Atom stehen muß, das durch mindestens eine Methylen-Gruppe von der Doppelbindung getrennt ist, d.h. also an C-4, C-5 oder C-6.

NMR-Spektrum VI, Seite 65

Wird dagegen bei $\delta = 1,7$ ppm eingestrahlt (C-5), wo gewöhnlich die Methylenprotonen von Cycloalkanen (Cycloheptan) absorbieren, wird das Methinproton an dem die Acetatgruppe tragenden C-Atom zum Singulett, während das Olefinproton eine Tripletttaufspaltung zeigt. Dies beweist nun, daß zwischen Methinproton und Olefinproton nicht eine, sondern zwei oder drei Methylengruppen stehen müssen.

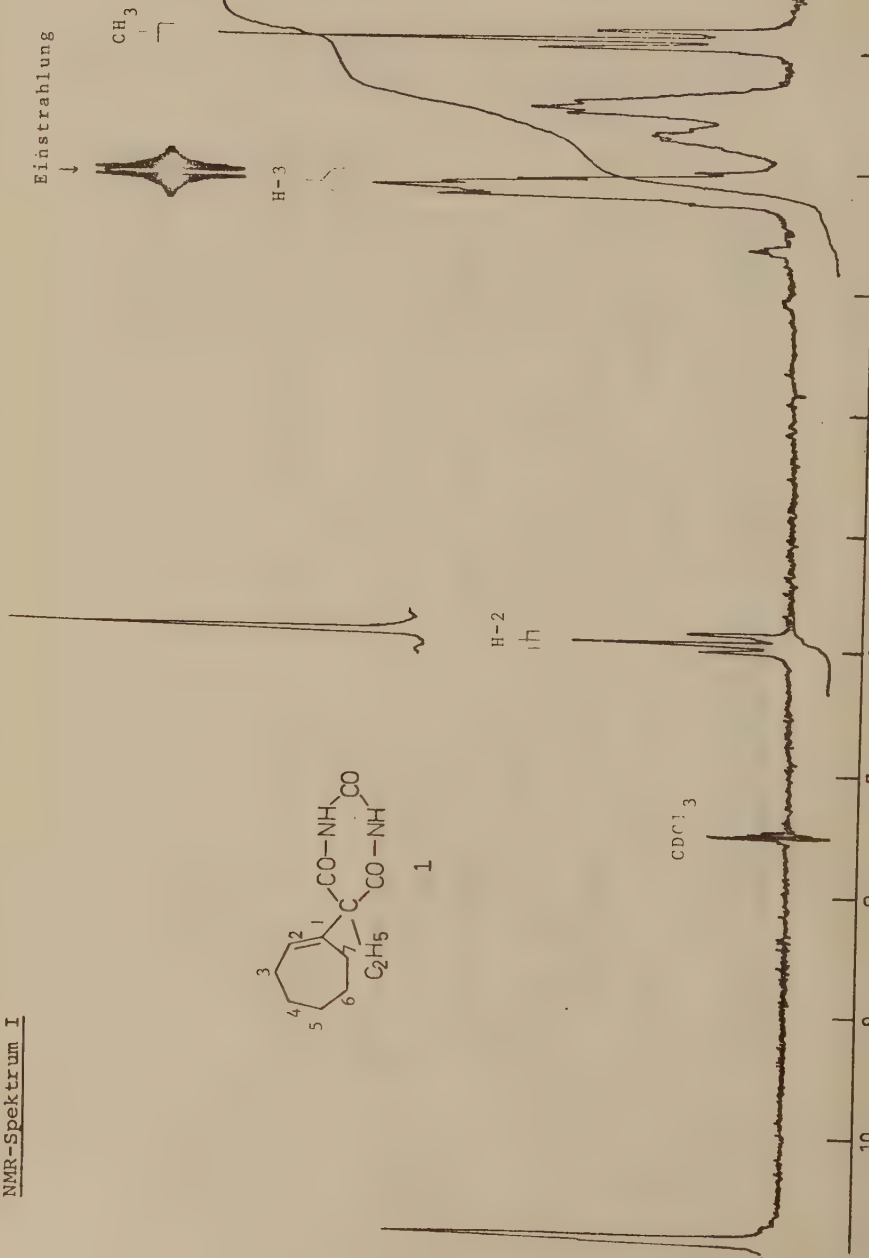
Die Acetatgruppe (in Verbindung 4a entsprechend die OH-Gruppe) steht auf Grund dieser Messungen entweder an C-5 oder C-6.

Chemische Verschiebung der Protonen der Verbindungen 1 - 4 (ppm)

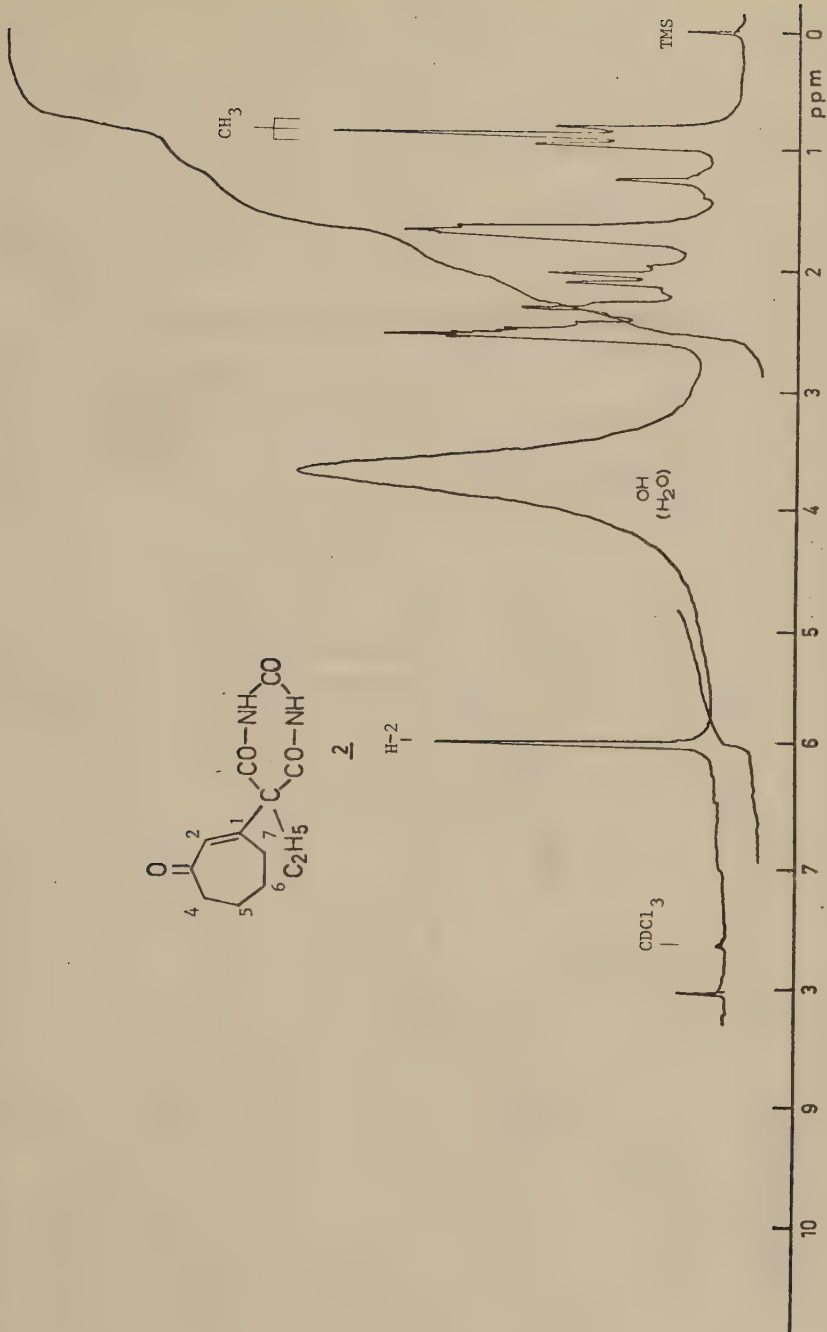
	H-2	H-3	H-4	Äthyl-			
				CH ₃	CH ₂	-NH-CO-	OH
<u>1</u>	5.95 (T; 7Hz)	2.13 (M)		0.88 (T)	2.1 (Q)	10.88	
<u>2</u>	6.07 (S)		2.33 (T)	0.90 (T)	2.1 (Q)		restl. CH ₂ : 1.3-1.8 1.7
<u>3as</u>	5.84 (D; 3Hz)	4.35 (M)		0.88 (T)	2.1 (Q)		4.4-4.7
<u>3a</u>	5.84 (D; 3Hz)	4.41 (M)		0.86	2.06	11.2	(4.3)
<u>3b</u>	5.76 (D; 3Hz)	5.43 (M)		0.88	2.06	11.4	
<u>4a</u>	5.93 (T; 7Hz)	ca. 2.11		0.88	2.10		
							H-5(6): 3.77 (Sept, 4Hz) restl. CH ₂ : ca. 1.8 CH ₃ CO-: 2.05 (S)
<u>4b</u>	5.94 (T; 7Hz)	ca. 2.27		0.87	(2.08)	7.28	
							H-5(6): 4.89 (Sept, 4Hz) CH ₃ CO-: 2.01 (S)

NMR-Spektrum I

- 60 -

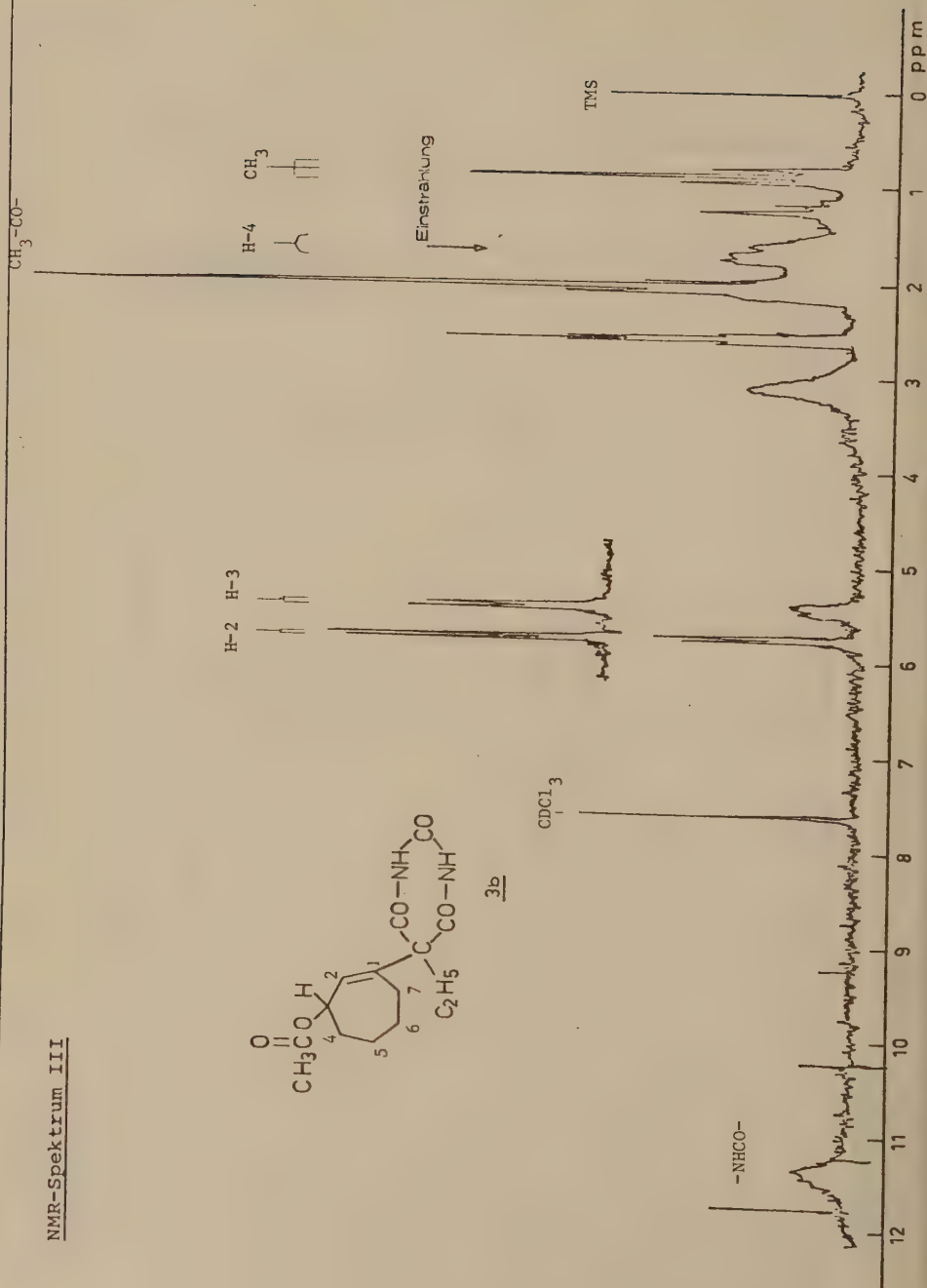


NMR-Spektrum II

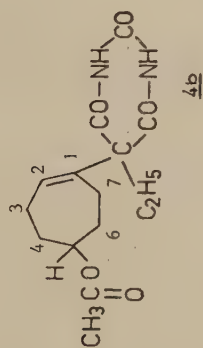


NMR-Spektrum III

- 62 -



NMR-Spektrum IV



$\text{CH}_3-\text{CO}-$

CH_3

H-2

H-5

TMS

CDCl_3

ppm

10

9

8

7

6

5

4

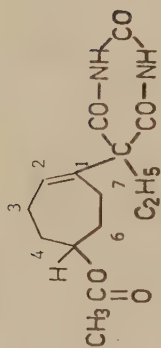
3

2

1

0

NMR-Spektrum V



4b

CH_3

H-3

H-5

H-2

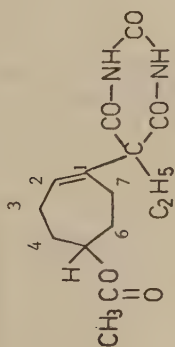
CDCl_3

Einstrahlung

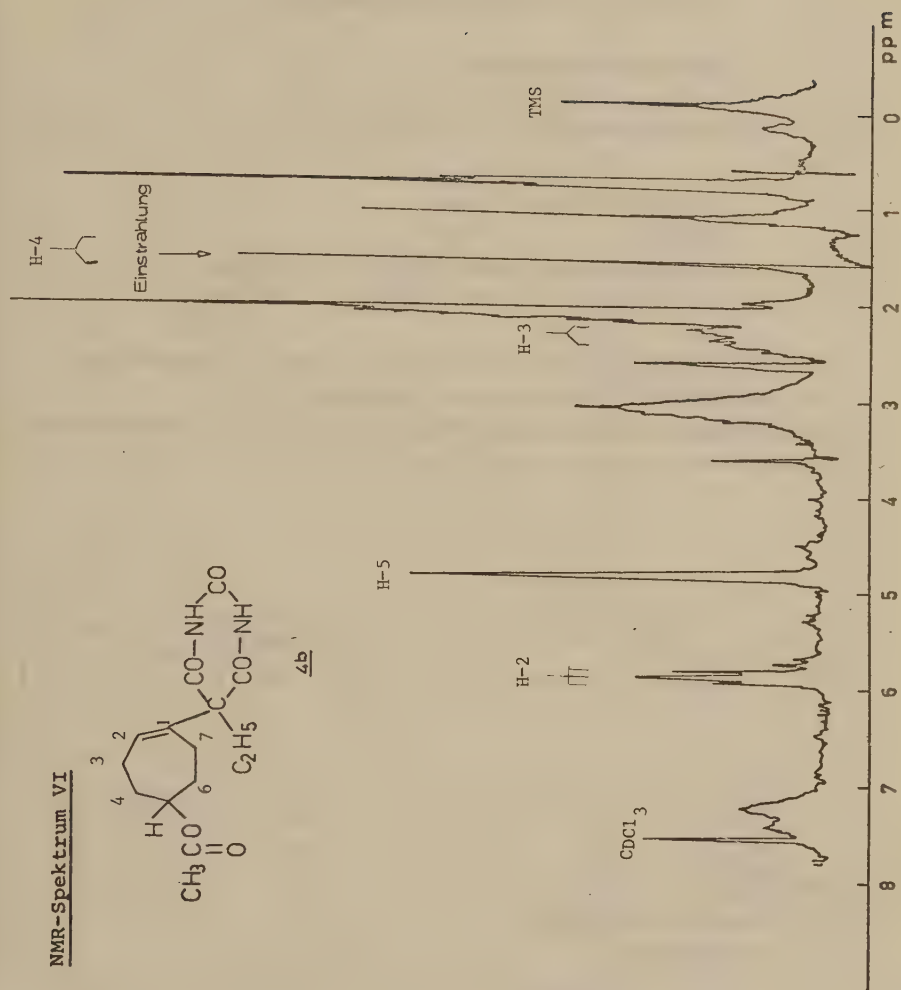
TMS

ppm

NMR-Spektrum VI



4b



7. Struktur der Ausscheidungsprodukte

7.1. Ausscheidungsprodukt I

Das Ausscheidungsprodukt I wurde durch folgende Daten charakterisiert:

hRf-Wert (Äther): 80
Schmp.: 172°
UV-Absorption: λ max (pH 10) : 239 nm
UV-Absorption: λ max (1nNaOH) : 255 nm

Die gleichen Werte zeigt Heptabarbital. Der Mischschmelzpunkt mit Heptabarbital zeigte keine Depression.

Die IR-Spektren des Ausscheidungsproduktes I und des Heptabarbitals waren identisch (Abbildung 7):

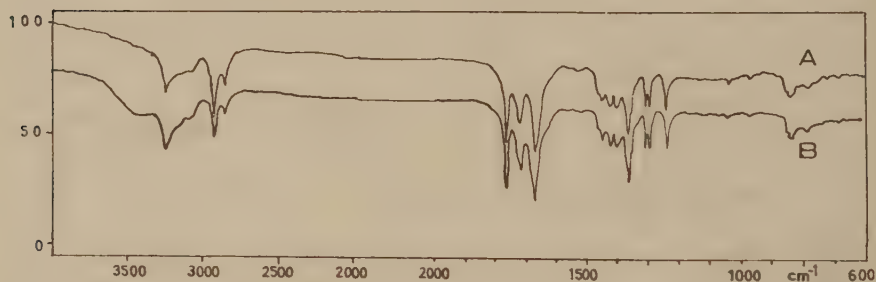


Abbildung 7

A = Ausscheidungsprodukt I

B = Heptabarbital

Es handelt sich somit um unverändert ausgeschiedenes Heptabarbital.

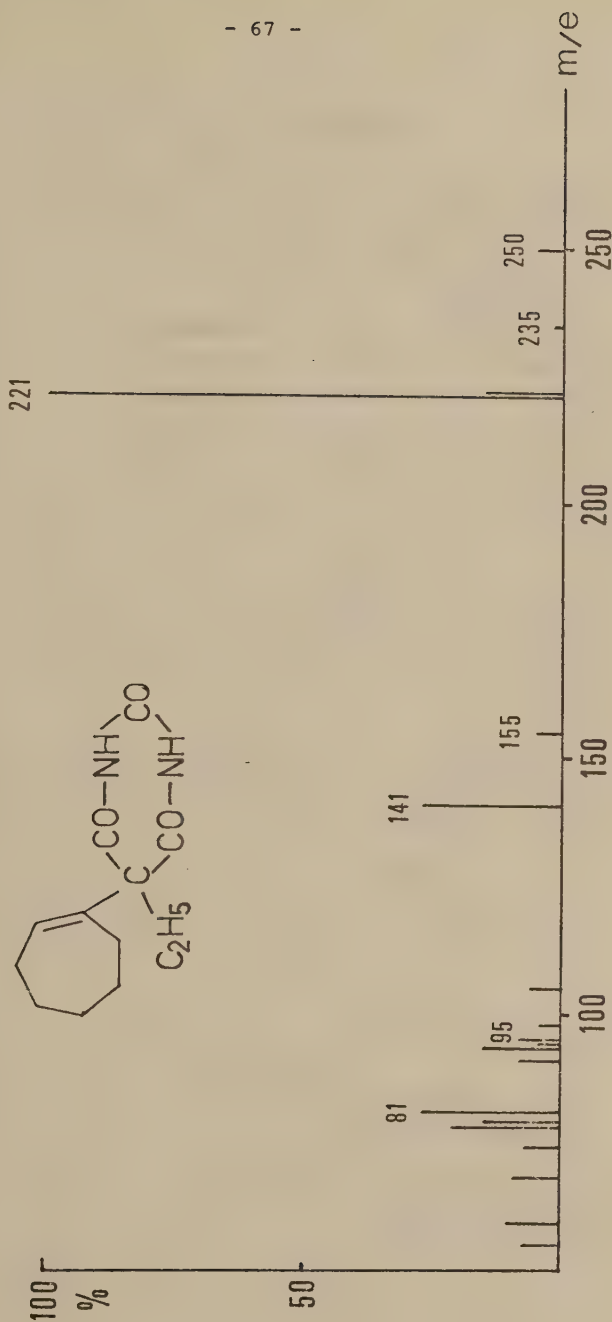


Abbildung 8
Massenspektrum des Heptabarbital.

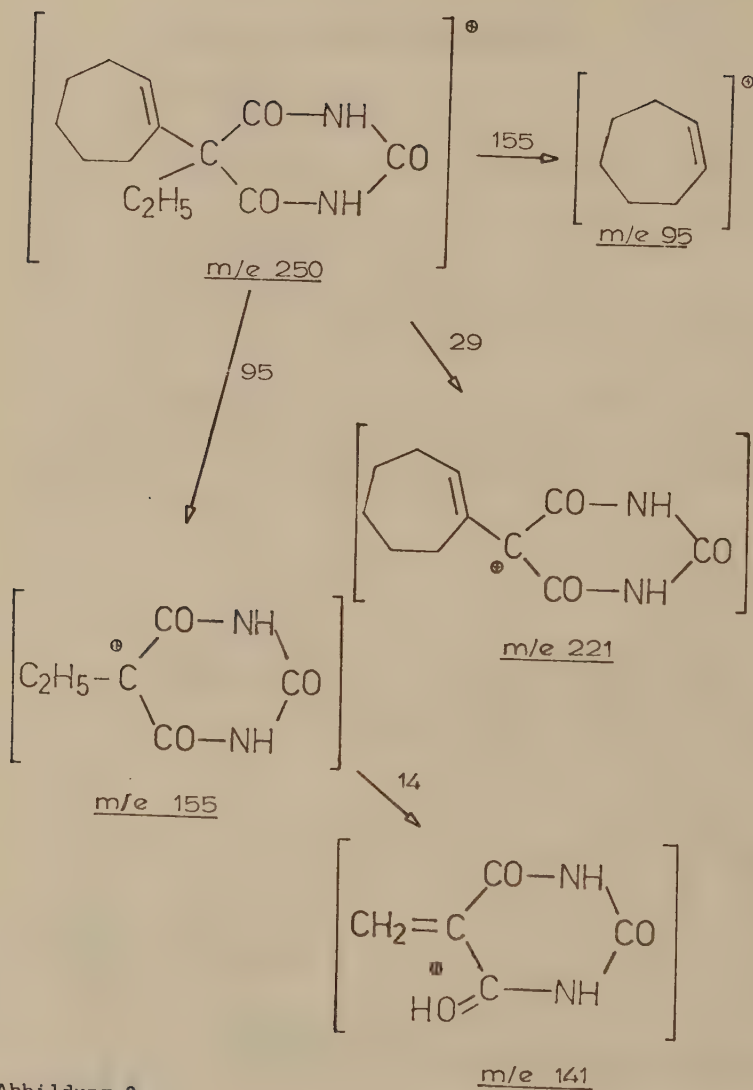


Abbildung 9

Zerfallsschema des Heptabarbitals.

7.2. Ausscheidungsprodukt II

Das Ausscheidungsprodukt II wurde durch folgende Daten charakterisiert:

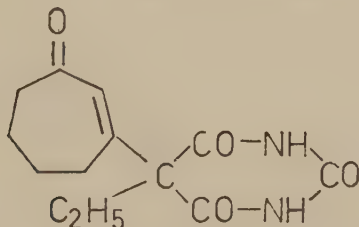
hRf-Wert (Äther):	60
Schmp.:	232°
Semicarbazon Schmp.:	250°
UV-Absorption: λ max (pH 10)	: 239 nm
UV-Absorption: λ max (1nNaOH)	: 255 nm

Die dünnschichtchromatographisch positive Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, sowie die Bildung eines Semicarbazons sprachen für das Vorhandensein einer Keto-Gruppe.

Das Massenspektrum (Abbildung 11) sprach für eine Keto-Gruppe im Siebenring. Das Zerfallsschema ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Die Fragmentierung erfolgte analog der des Heptabarbitals (Abbildung 8, Zerfallsschema Abbildung 9).

Alle Daten waren gleich mit der nach Formelschema I und II hergestellten Substanz. Die Mischschmelzpunkte zeigten keine Depression. Die IR-Spektren (Abbildung 10 A,B,C) waren identisch.

Bei Ausscheidungsprodukt II handelt es sich um 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure:



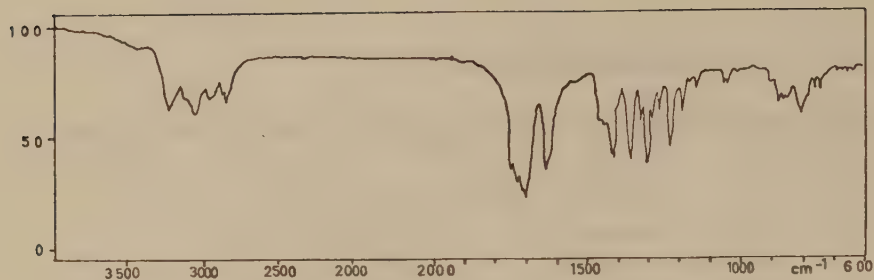


Abbildung 10 A

IR-Spektrum des Ausscheidungsproduktes II

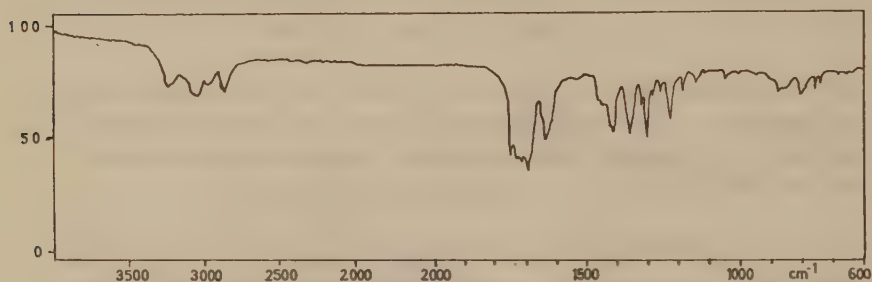


Abbildung 10 B

IR-Spektrum der 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure
nach Formelschema I, Seite 38

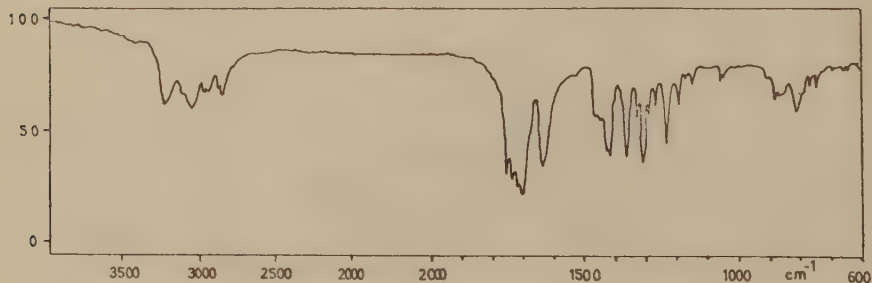


Abbildung 10 C

IR-Spektrum der 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure
nach Formelschema III, Seite 39

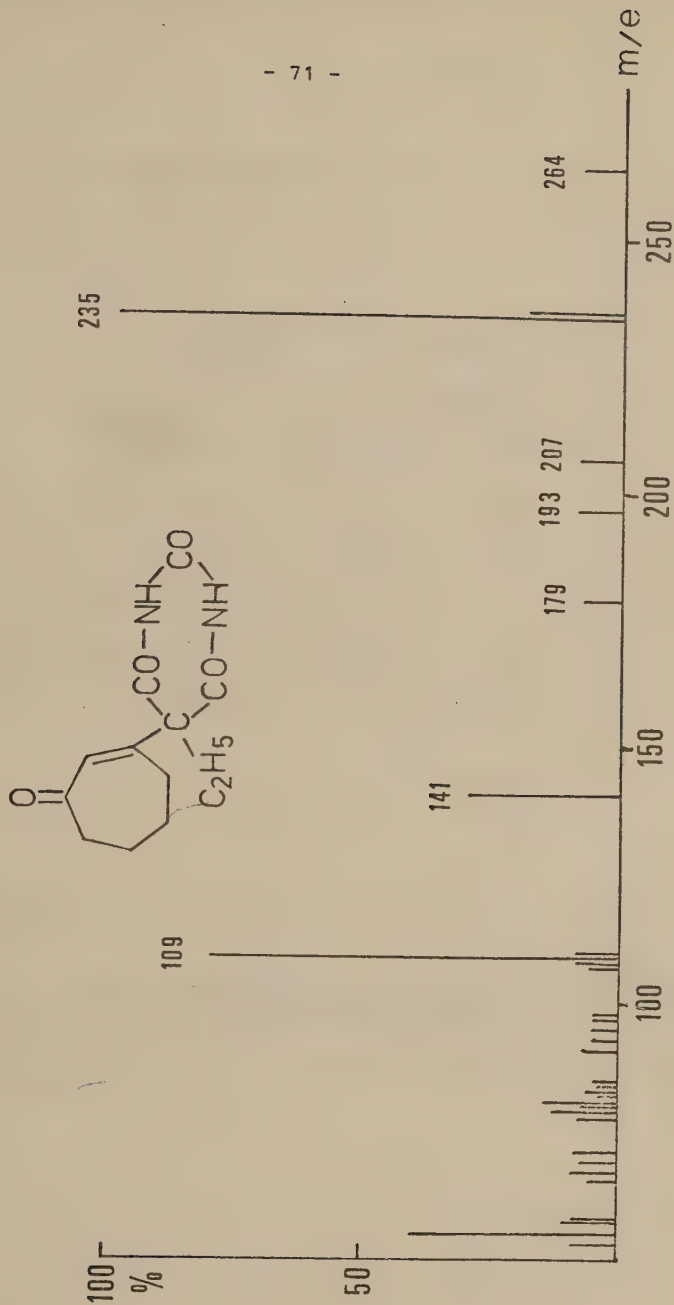


Abbildung 11
Massenspektrum des Ausscheidungsproduktes II

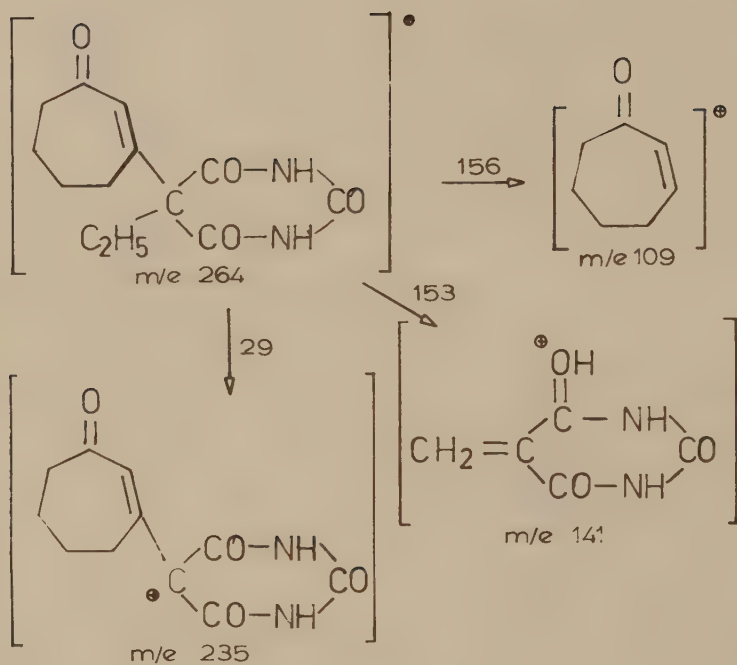


Abbildung 12

Zerfallsschema des Ausscheidungsproduktes II

7.3. Ausscheidungsprodukt III

Das Ausscheidungsprodukt III wurde durch folgende Daten charakterisiert:

hRf-Wert (Äther):	50
Schmp.:	179°
Acetat-Schmp.:	205-206°
UV-Absorption λ max (pH 10)	: 240,5 nm
UV-Absorption λ max (1nNaOH)	: 253 nm

Das Massenspektrum (Abbildung 14) sprach für eine OH-Gruppe im Siebenring. Die Fragmentierung erfolgte analog der des Heptabarbitals (Zerfallsschema, Abbildung 15). Zusätzlich tritt jedoch ein kräftiger Peak bei $m = 219$ auf. Er kann durch H_2O -Abspaltung aus dem Siebenring erklärt werden. Dafür spricht auch das Auftreten eines metastabilen Peaks bei $m = 202,4$ der durch den Übergang von $m_1 = 235$ nach $m_2 = 219$ nach

$$m^* = \frac{(m_2)^2}{m_1}$$

erklärt werden kann. Der metastabile Peak konnte in der Art der Darstellung in Abbildung 14 nicht berücksichtigt werden.

Ausscheidungsprodukt III war in allen Daten identisch mit der nach Formelschema II hergestellten Verbindung. Die Mischschmelzpunkte zeigten keine Depression. Die IR-Spektren waren identisch (Abbildung 13 A,B).

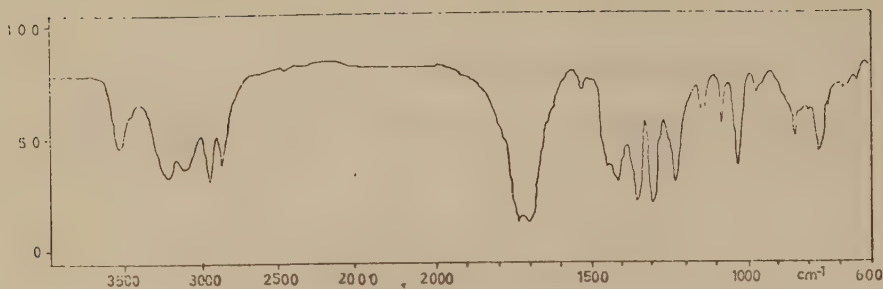


Abbildung 13 A: IR-Spektrum Ausscheidungsprodukt III

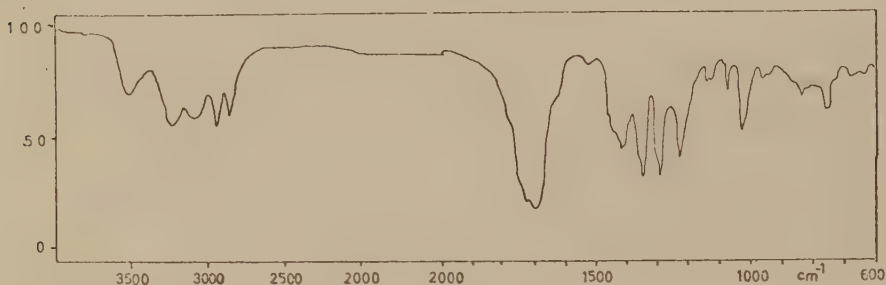
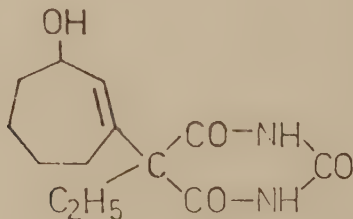


Abbildung 13 B: IR-Spektrum der 5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure nach Formelschema II, Seite 39

Die OH-Gruppe konnte durch Oxidation nach Kapitel 5.2.3. in eine Keto-Gruppe umgewandelt werden. Diese Substanz war in allen Daten mit 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure identisch (Kapitel 7.2.).

Bei Stoffwechselprodukt III muß es sich daher um 5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure handeln:



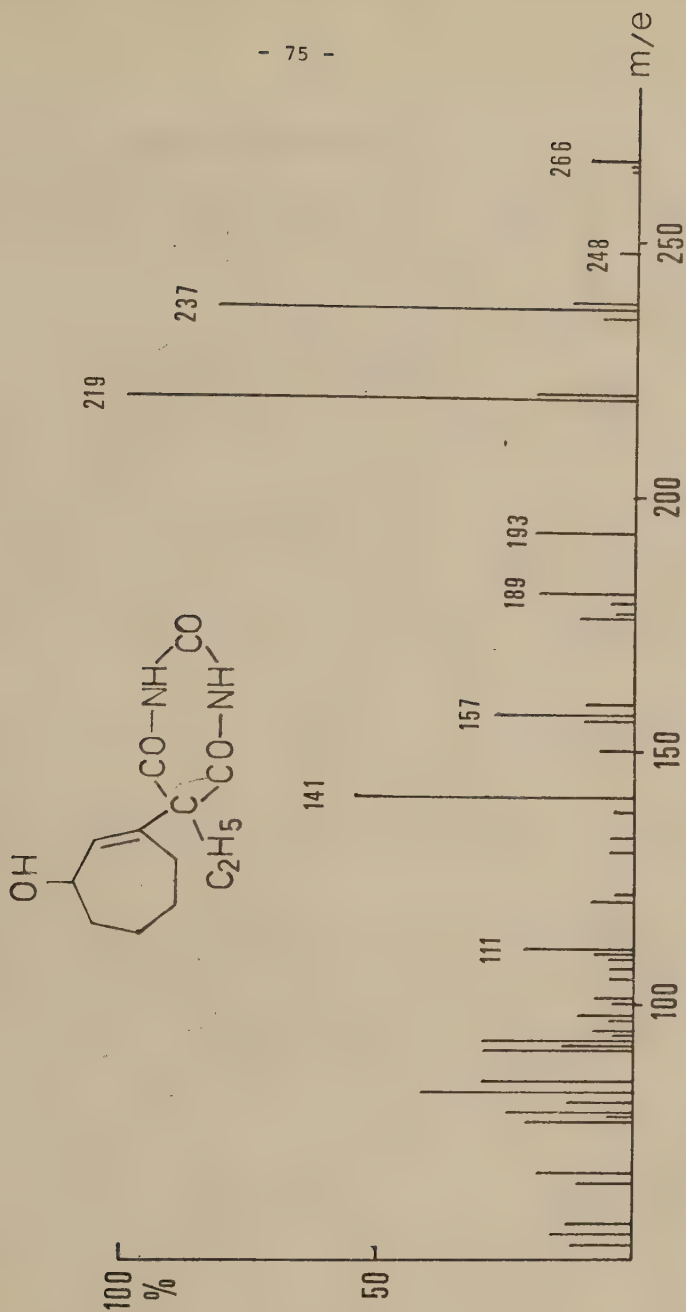


Abbildung 14
Massenspektrum des Ausscheidungsproduktes III

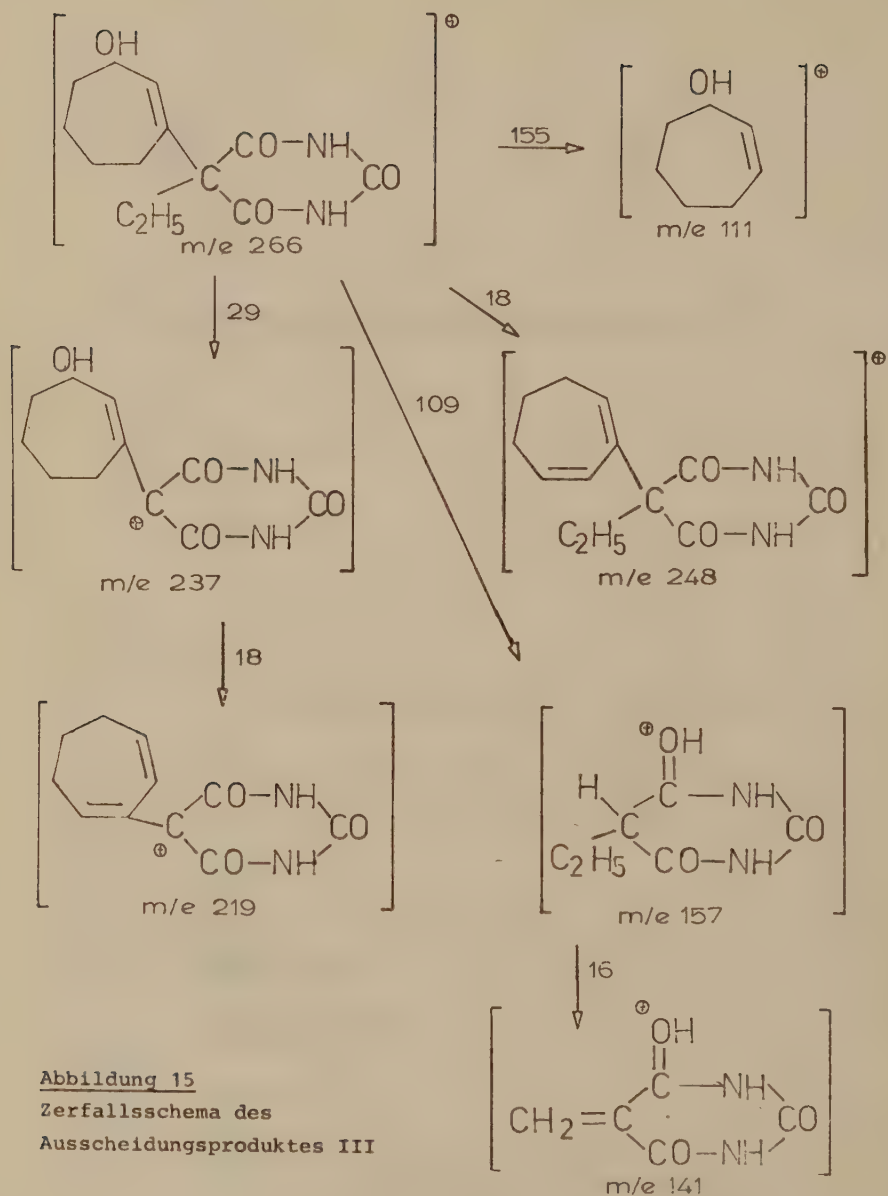


Abbildung 15

Zerfallsschema des

Ausscheidungsproduktes III

7.4. Ausscheidungsprodukt IV

Das Ausscheidungsprodukt IV wurde durch folgende Daten charakterisiert:

hRf-Wert (Äther):	35
Schmp.:	131-132°
hRf-Wert des Acetats (Äther):	55
UV-Absorption λ max (pH10) :	239 nm
UV-Absorption λ max (1nNaOH):	255 nm

IR-Spektrum:

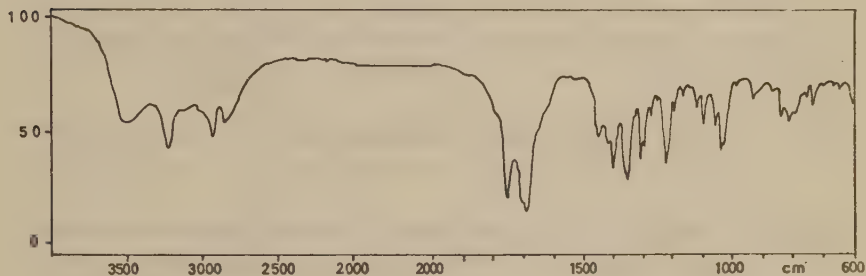


Abbildung 16 : IR-Spektrum des Ausscheidungsproduktes IV

Das Massenspektrum (Abbildung 17) sprach für eine OH-Gruppe im Siebenring. Die Fragmentierung erfolgte analog dem für Ausscheidungsprodukt III aufgestellten Schema (Abbildung 15). Auf Grund der NMR-Spektren mußte für die Lage der OH-Gruppe die 5- oder 6-Stellung im Siebenring angenommen werden.

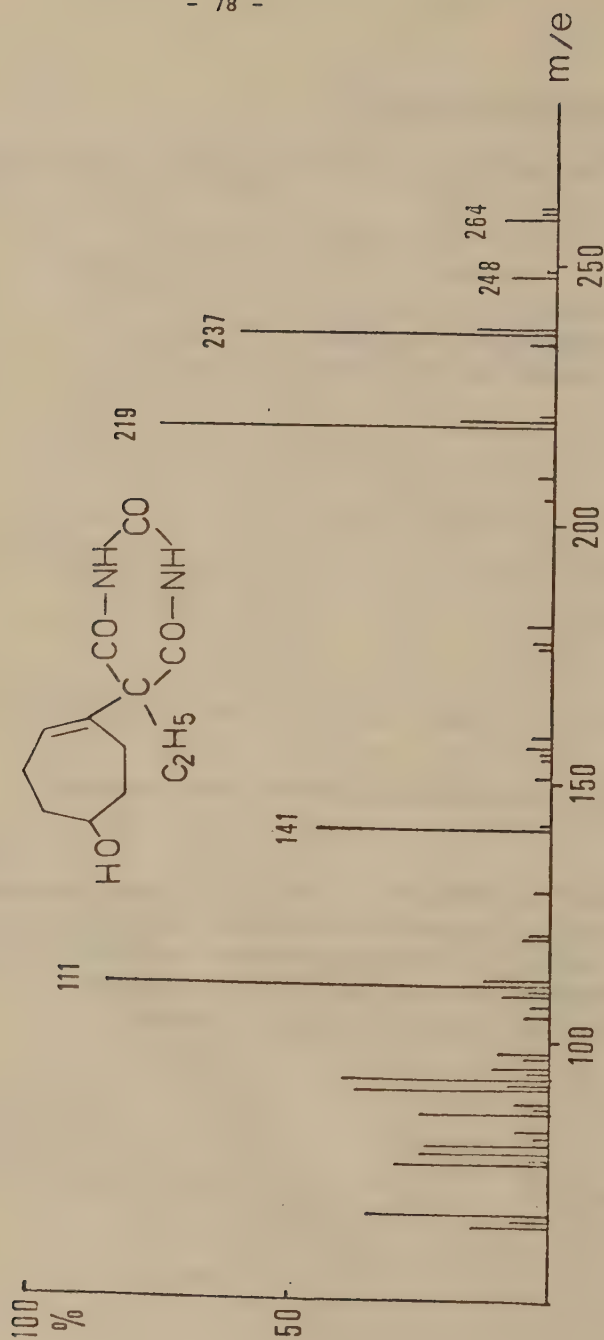


Abbildung 17
Massenspektrum des Ausscheidungsproduktes IV

Da diese Verbindungen nicht synthetisiert werden konnten (siehe Kapitel 5.1.), wurden die entsprechenden hydrierten Verbindungen 5-Äthyl-5-(3-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure (Kapitel 5.2.5.), 5-Äthyl-5-(4-hydroxycycloheptan-1-yl)barbitursäure (Kapitel 5.2.4.) und das hydrierte Ausscheidungsprodukt miteinander verglichen.

Die Massenspektren der hydrierten Hydroxy-Derivate zeigten fast keinen Unterschied zum Heptabarbital. Nur bei hoher Empfindlichkeit ließen sich im Bereich des Molekularpeaks drei schwache Fraktionen mit $m = 268$, $m = 267$ und $m = 266$ erkennen, das heißt, daß sofort unter Wasserabspaltung der Cyclohepten-Ring gebildet wird. Der weitere Zerfall ist dann mit dem des Heptabarbitals identisch.

Auch auf Grund der NMR-Spektren konnte die Stellung der OH-Gruppe nicht eindeutig entschieden werden.

Wasserabspaltung erfolgte außerordentlich leicht und besonders bei Erwärmung, so daß keine einheitlichen Schmelzpunkte und IR-Spektren erhalten wurden.

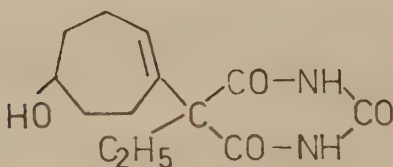
Dünnschichtchromatographisch zeigten die drei Hydroxycycloheptan-Derivate folgende R_f -Werte:

hydriertes 3-Hydroxy-Derivat,	R_f -Wert (Äther): 44
hydriertes 4-Hydroxy-Derivat,	R_f -Wert (Äther): 38
hydriertes Ausscheidungsprodukt IV,	R_f -Wert (Äther): 38

Alle zeigten noch eine weitere schwache Fraktion mit dem hRf-Wert 80, die den OH-freien Zersetzungsprodukten entspricht.

Das 3-Hydroxy-Derivat ließ sich einwandfrei von dem hydrierten Ausscheidungsprodukt IV abtrennen. Es entspricht auf Grund der Symmetrie des Siebenringes dem 6-Hydroxy-Derivat. Diese Stellung kann daher ausgeschlossen werden.

Das 4-Hydroxy-Derivat ließ sich nicht abtrennen. Es entspricht dem 5-Hydroxy-Derivat. Da auf Grund der NMR-Spektren (Kapitel 6.) nur die 5- oder die 6-Stellung in Frage kam, mußte es sich bei dem Ausscheidungsprodukt IV mit großer Wahrscheinlichkeit um 5-Äthyl-5-(5-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure handeln:



8. Allgemeiner Teil

8.1. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel von der Firma E. MERCK, Darmstadt und der Firma Dr. Theodor SCHUCHARDT GmbH, München bezogen. Soweit erhältlich wurde p.A.-Ware verwendet.

Cyclohexan-1,3-dion wurde von der Firma EGA CHEMIE KG, Steinheim bezogen.

Heptabarbital-Reinsubstanz wurde freundlicherweise von der Firma CIBA-GEIGY, Wehr/Baden zur Verfügung gestellt.

Äthanol ist 96 % vergällt mit 1 % Petroläther.

Boratpuffer 0,05 m (pH 10)

Lösung A: 12,202 g Borsäure werden in 100 ml 1n NaOH gelöst und mit Wasser auf 1.000 ml aufgefüllt.

Lösung B: n/10 NaOH

Gebrauchsfertige Lösung: 6 Teile A und 4 Teile B werden gemischt.

8.2. Dünnschichtchromatographie

Alle Dünnschichtplatten wurden mit dem Unoplan-Streichgerät der Firma SHANDON Scientific Comp. Ltd., London, selbst hergestellt. Es wurde Kieselgel HF₂₅₄ (Typ 60) der Firma E.MERCK, Darmstadt verwendet. Die Schichtdicke betrug 0,3 mm, die Größe der Glasplatten 20 x 20 cm. Für die präparativen Probleme wurden die

gleichen Platten verwendet, da "Kieselgel PF₂₅₄" keine befriedigenden Trennergebnisse ergab.

Die Platten wurden nach Lufttrocknung 45 Minuten bei 110-120° aktiviert und sofort nach dem Abkühlen verwendet oder bis zu 24 Stunden über Blaugel aufbewahrt.

Die Entwicklung erfolgte in mit Filterpapier ausgekleideten Trennkammern (Nr. 120160) der Firma DESAGA, Heidelberg.

Die Lokalisation von fluoreszenzlöschenden Fraktionen erfolgte vor dem Besprühen mit Reagenzien unter UV-Licht (Quarzlampe mit Filter 254 nm der QUARZLAMPEN GmbH, Hanau).

8.3. Meßgeräte

UV

Alle Spektren wurden mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer Typ DK2 der Firma BECKMAN aufgenommen.

IR

Infrarotspektren sind in KBr-Technik mit dem Gerät IR-8 der Firma BECKMAN aufgenommen.

3 mg Substanz wurden mit 300 mg KBr in einer Achatschale mit Achatpistill verrieben und unter 8 t - Druck zu einem 5 x 25 mm großen Preßling gepreßt. Ölige Substanzen wurden als Film auf einem KBr-Preßling aufgenommen. Mit Hilfe der IR-Spektren konnte bei präparativen Arbeiten in vielen Fällen der Verlauf der Reaktion und das Endprodukt überprüft werden.

MS

Die Massenspektren wurden mit dem CH-4-Gerät der Firma VARIAN-ATLAS im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg aufgenommen.

NMR

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 100 MHz-Spektrometer INM-PS-100 der Firma JEOL, Tokyo (Japan) im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg aufgenommen. Als Rechner diente ein 20 K Kernspeicher (TEXAS Instruments 980A) 16 K Kernspeicher standen für die Datenaufnahme zur Verfügung. Das Gerät wurde durch eine großzügige Unterstützung der STIFTUNG VOLKSWAGENWERK zur Verfügung gestellt.

8.4. Sonstiges

Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunkt-Mikroskop der Firma LEITZ bestimmt. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Rotationsverdampfer

Typ Rotavapor R der Firma BÜCHI, Flawil/Schweiz, mit von 30-90°C regelbarem Wasserbad.

Vakuum einer Wasserstrahlpumpe.

Vakuumdestillation

Das für bei präparativen Arbeiten erforderliche Vakuum bei Vakuumdestillationen wurde mit einer Gasballastpumpe Typ D2 der Firma LEYBOLD, Köln erzeugt.

Zusammenfassung

Nach Heptabarbitalaufnahme wurden beim Menschen vier renale Ausscheidungsprodukte isoliert. Sie wurden identifiziert als:

- I = 5-Äthyl-5-(cyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure
(Heptabarbital)
- II = 5-Äthyl-5-(3-oxocyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure
- III = 5-Äthyl-5-(3-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure
- IV mit großer Wahrscheinlichkeit =
5-Äthyl-5-(5-hydroxycyclohept-1-en-1-yl)barbitursäure.

Auf Grund der bei der Auswertung der NMR-Spektren erhaltenen Ergebnisse muß vermutet werden, daß in sehr geringer Menge noch ein weiteres Stoffwechselprodukt auftritt, das der Verbindung IV sehr ähnlich ist.

Bei quantitativen Untersuchungen des Ausscheidungsverlaufes an zehn Personen wurden nach Aufnahme therapeutischer Dosen (200-400 mg Heptabarbital) 32 - 60 % der aufgenommenen Dosis wiedergefunden, davon 0,9 - 2,1 % unverändert (Lit.³⁶⁾ : 1 % Keto-Derivat). Die Hälfte davon erschien etwa innerhalb der ersten 12 Stunden. Nach 48 Stunden war dünnschichtchromatographisch kein Barbiturat mehr nachweisbar.

Bei acht Personen war die Verteilung auf die Stoffwechselprodukte II : III : IV wie 2 : 2 : 1, zwei Personen zeigten eine andere Verteilung.

Literaturverzeichnis

- 1) ALEXANDER, E.R., A.C.COPE
J.Amer.chem.Soc. 66, 886 (1944)
- 2) ARNOLD, W., H.F.GRÜTZMACHER
Arch.Tox. 25, 200 (1969)
- 3) BRANDENBERGER, H.
Clinical Biochemistry Vol. II
Herausgeber: H.Ch.Curtius, Marc Roth
Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York 1974
- 4) BUSH, M.T., T.C.BUTLER, H.L.DICKINSON
J.Pharmacol.exp.Therapeut. 108, 104 (1953)
- 5) BUSH, M.T. and E.SANDERS
Ann.Rev.Pharmacol. 7, 57 (1967)
- 6) CLARKE, E.G.C.
Isolation and Identification of Drugs.
The Pharmaceutical Press, London 1969
- 7) COCHIE, J. and J.W.DALY
J.Pharmacol.exp.Therapeut. 139, 154 (1963)
- 8) COPE, A.C., E.M.HANCOCK
J.Amer.chem.Soc. 61, 776 (1939)
- 9) COPE, A.C., T.A.LISS, G.W.WOOD
J.Amer.chem.Soc. 79, 6287 (1957)

- 10) CURRY, A.S.
J.Pharm.Lond. 7, 1072 (1955)
- 11) CURRY, A.S.
Poison Detection in human organs.
in: Charles C. Thomas, Springfield, III, 1963
- 12) EHRHART, G., H.RUSCHIG
Arzneimittel Band I
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1972
- 13) EISTERT, B., F.HAUPTER, K.SCHANK
Liebigs Ann.Chem. 665, 55 (1963)
- 14) FISCHER, E. und J.v.MEERING
J.Therap.Gegenw. 44, 97 (1903)
- 15) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.
Klinisch-chemische Diagnostik von Vergiftungen.
Thieme Verlag, Stuttgart, im Druck
- 16) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., G.MACHBERT, J.GELDMACHER
Arzneim.-Forsch. 18, 350 (1968)
- 17) GOLDBAUM, L.R.
Analyt.Chem. 24, 1604 (1952)
- 18) GOLDSCHMIDT, St. und R.WEHR
Z.physiol.Chem. 308, 9 (1957)
- 19) GOLDSCHMIDT, St. and Fr.W.KOSS
Z.physiol.Chem. 316, 224 (1959)
- 20) GOLDSCHMIDT, St. and Fr.W.KOSS
Z.physiol.Chem. 316, 233 (1959)

- 21) HEIN, A.W., M.J.ASTLE, J.R.SHELTON
J.Org.Chem. 26, 4874 (1961)
- 22) JONES, G.
Organic Reactions 15, 204 (1967)
- 23) MACHBERT, G., M.GELDMACHER-v.MALLINCKRODT
Beitr.Gerichtl.Med. 25, 278 (1969)
- 24) MARK, C.
Clin.Pharmacol.Ther. 4, 504 (1963)
- 25) MAYNERT, E.W.
J.Biol.Chem. 195, 397 (1952)
- 26) MAYNERT, E.W.
J.Biol.Chem. 195, 403 (1952)
- 27) MAYNERT, E.W.
J.Pharmacol.exp.Therapeut. 150, 115 (1965)
- 28) MAYNERT, E.W.
J.Pharmacol. exp.Therapeut. 150, 476 (1965)
- 29) MAYNERT, E.W. and J.M.DAWSON
J.Biol.Chem. 195, 389 (1952)
- 30) MAYNERT, E.W. and H.B.van DYKE
Science 110, 661 (1949)
- 31) MAYNERT, E.W., L.LOSIN
J.Pharmacol. 115, 275 (1955)

- 32) NORMAN, R.
Organic Reactions 5, 331 (1949)

- 33) ORGANIKUM,
4. Auflage, VEB Deutscher Verlag der
Wissenschaften, Berlin 1964

- 34) PREUSS, R., D. MÜLLER
Arzneim.-Forsch. 18, 412 (1968)

- 35) PREUSS, R., D. MÜLLER
Arzneim.-Forsch. 18, 714 (1968)

- 36) PULVER, R.
Schweiz. Med. Wschr. 72 1333 (1942)

- 37) RABJOHN, N.
Organic Reactions 5, 331 (1949)

- 38) RAVENTOS, J.
J. Pharm. Lond. 6, 217 (1954)

- 39) RICHARDS, R. K. and J. D. TAYLOR
Aesthesiology (Philadelphia) 17, 415 (1956)

- 40) SCHMIDT, G.
Arch. Toxicol. 17, 93 (1958/59)

- 41) SCHMIDT, G.
Meth. forensic Sci. 1, 375 (1962)

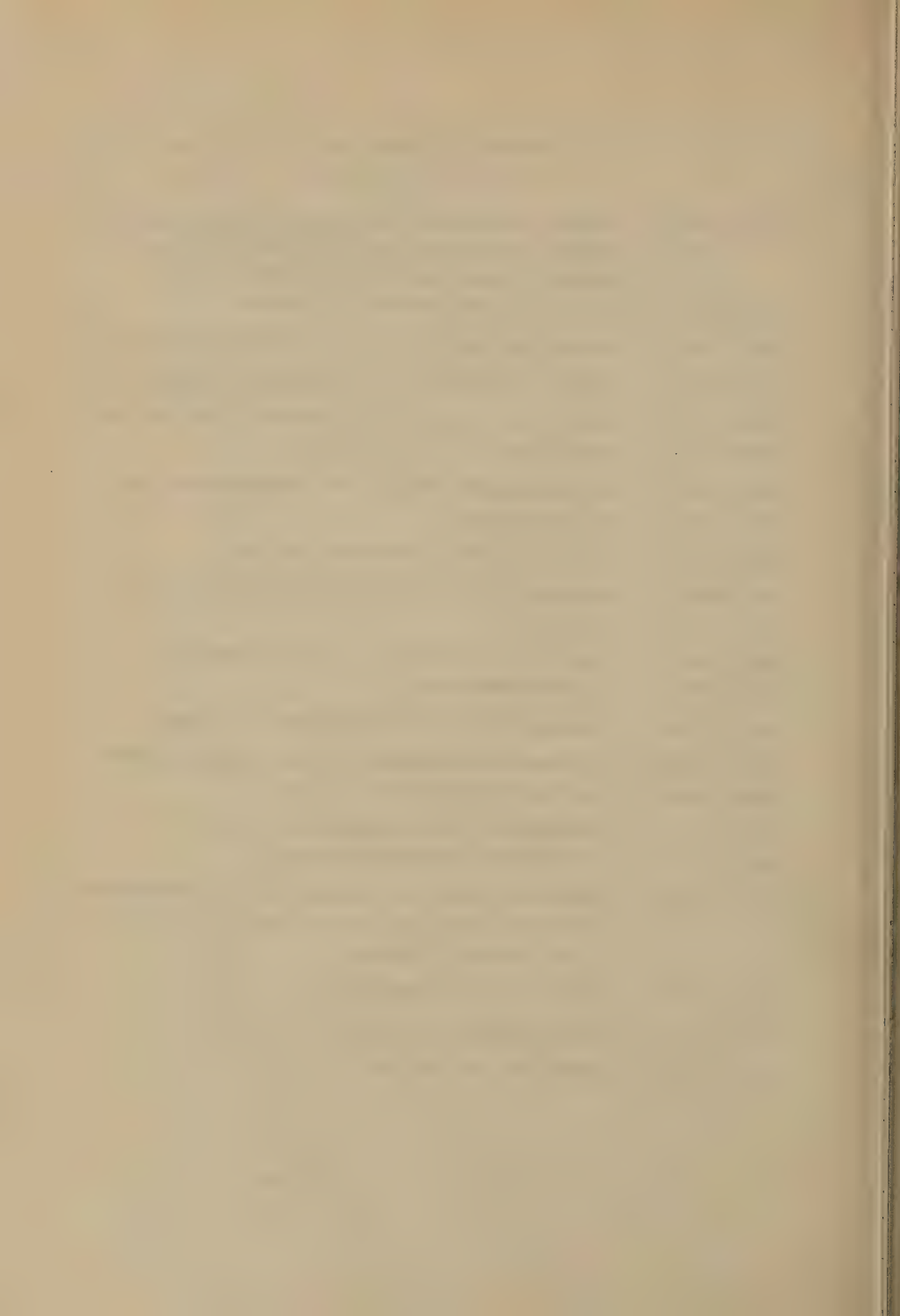
- 42) SOEHRING, K., M. FRAHM, A. GOTTESLEBEN
Pharmac. Acta Helv. 38, 785 (1963)

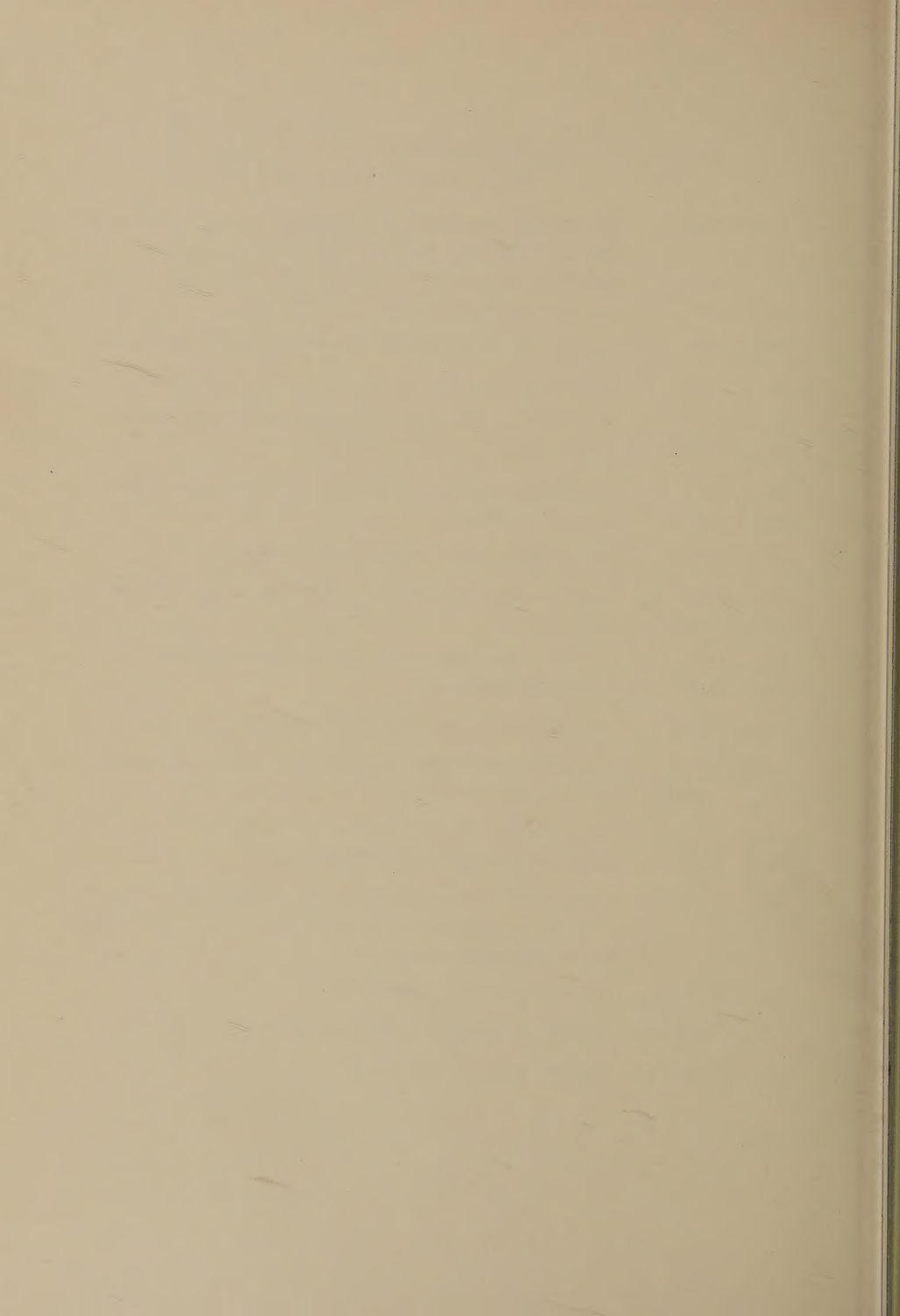
- 43) STAHL,E.
Dünnschichtchromatographie.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967
- 44) STAINER,C., J.BOSLY, Fr.DUTRIEUX, R.STAINER
Pharm.Acta Helv. 38, 587 (1963)
- 45) STEVENSON,G.W.
Analyt.Chem. 33, 1374 (1961)
- 46) STEWARD,C.P., A.STOLLMAN
Toxicology I
Academic Press, New York, London 1960
- 47) TITUS,E., H.WEIS
J.Pharmacol. 106, 277 (1952)
- 48) TOKI,K., S.TOKI, H.TSUKAMOTO
J.Biochem. (Tokyo) 53, 43(1963)
- 49) TREIBS,W., P.GROSSMANN
Chem.Berichte 90, 103 (1937)
- 50) TSUKAMOTO,H., H.YOSHIMURA, H.IDE
Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) 11, 9 (1963)
- 51) WADDEL,W.J.
Fed.Proc. 21, 182 (1962)
- 52) WALDI,D.
in: Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie und
Anleitung zur Ausmittlung der Gifte.
Herausgeber: E.Graf und Fr.R.Preuß
3. Auflage, Band II
Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen 1966

- 53) WILLIAMS, R.T.
Detoxications Mechanism. 2.Auflage
Chapman & Hill Ltd., London 1959
- 54) VIDIC, E., K.GOEBEL
Arch.Tox. 19, 85 (1961)

L E B E N S L A U F

- 29.10.1940 Geboren in Dresden als letztes von drei Kindern.
Vater: Walter Schütz, Sparkassenbeamter.
Mutter: Lieselotte Schütz, geb. Manthey.
- 1946-1951 Besuch der Volksschule in Grömitz.
- 1951-1961 Besuch des Gymnasiums in Oldenburg in Holstein.
- 10.02.1961 Abitur am Gymnasium in Oldenburg in Holstein.
- März 1961 - Studium der Naturwissenschaften an der Univer-
August 1961 sität Kiel.
- Okt. 1961 - Apothekerpraktikant in der Schanzen-Apotheke
Sept. 1963 in Eckernförde.
- 09.09.1963 Pharmazeutische Vorprüfung in Kiel.
- Okt. 1963 - Studium der Naturwissenschaften an der Univer-
Sept. 1964 sität Kiel.
- Okt. 1964 - Studium der Pharmazie an der Universität
März 1968 Erlangen-Nürnberg.
- 14.03.1968 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen.
- April 1968 - Kandidat der Pharmazie in der Linden-Apotheke
Sept. 1968 in Neustadt/Holstein.
- Okt. 1968 - Studium der Naturwissenschaften an der
Aug. 1969 Universität Erlangen-Nürnberg.
- ab 1.09.1969 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistenten-
stelle im Institut für Rechtsmedizin der Univer-
sität Erlangen-Nürnberg.
- 09.09.1969 Bestallung als Apotheker.
- 30.08.1967 Eheschließung mit Barbara Lürman.
- 22.07.1974 Geburt des ersten Kindes.





Copie - Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30